

Desenvolvimento de bolachas com incorporação de diferentes microalgas

Solange Pereira Fragoso

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador(es): Ana Paula dos Santos Batista

Patrícia Catarina das Neves Bordalo Branco Fradinho

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Ana Paula dos Santos Batista, Bolseira Pós-Doutoramento do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutora Maria Cristiana Henriques Nunes, Professora Auxiliar da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Agradecimentos

À Doutora Ana Paula Batista e à Engenheira Patrícia Fradinho, por toda a orientação, disponibilidade, apoio prestado e conhecimento transmitido ao longo da elaboração deste trabalho.

Ao Professor Mário Tredici e ao Doutor Alberto Niccolai do DISPAA da Universidade de Florença pela cedência da biomassa de microalga bem como pela possibilidade de colaboração nesta parceria.

À professora Anabela Raymundo, por ter sido incansável no início desta etapa e pelas palavras de motivação nos momentos mais complicados.

Ao Engenheiro Daniel Duarte e à Engenheira Diana Faria por toda a ajuda dada em termos laboratoriais ao longo destes meses.

Aos meus pais, Manuel e Florbela, por me terem proporcionado a oportunidade de tirar a Licenciatura e o Mestrado e por toda a paciência, apoio e carinho.

À minha irmã, Ana, pelas tardes perdidas a ajudar-me e por toda a paciência.

Aos meus amigos, Cláudia Garcia, Rita Ribeiro, Carlota Neves, Mariana Silva, Diana Vale, Sofia Lourenço e Luiz Corrêa por me ouvirem nos dias de neura e por todo o apoio.

Este trabalho foi financiado por fundos nacionais da Fundação para a Ciência e Tecnologia através da Unidade de Investigação LEAF - Linking Landscape, Environment Agriculture and Food (UID/AGR/04129/2013).

O meu muito obrigado a todos, sem vocês a realização deste trabalho não teria sido possível.

Para a minha querida avó

Resumo

Devido ao seu potencial como fonte de vários compostos bioativos, as microalgas são capazes de aumentar o valor nutricional de alimentos convencionais, afetando positivamente a saúde humana. O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de bolachas doces com incorporação de diferentes concentrações (2% e 6% m/m) de quatro microalgas diferentes: *Spirulina platensis* F&M-C256, *Chlorella vulgaris* Allma, *Tetraselmis suecica* F&M-M33 e *Phaeodactylum tricornutum* F&M-M40. Foram avaliadas características como a textura, a cor e a atividade da água das bolachas ao longo de oito semanas, não se encontrando diferenças significativas em termos de cor e de textura ($p < 0,05$) nas amostras analisadas. Em relação à atividade da água, todas as bolachas apresentaram valores inferiores a 0,5 após oito semanas de armazenamento. A bolacha com incorporação de 6% de *Spirulina* foi a que apresentou valores mais elevados de firmeza, em resposta a testes de penetração simples. A caracterização reológica das massas (antes da cozedura) também revelou para esta amostra valores mais elevados de viscosidade e dos módulos viscoelásticos (G' e G''). Consequentemente, utilizando 6% de *Spirulina*, foi possível reduzir o teor de farinha de 49% para 37% (m/m) e manter propriedades viscoelásticas semelhantes aos da massa de bolacha controlo. A avaliação da composição química demonstrou ser o teor proteico o parâmetro em que se verificaram diferenças mais significativas ($p < 0,05$), sendo as bolachas com 6% de *Spirulina* e de *Chlorella* as que apresentaram maior teor proteico (7,8-8,0%) comparativamente ao controlo (4,9%). O teor de ficocianina foi de 172 mg/kg e 363 mg/kg para as bolachas com incorporação de 2% e 6% de *Spirulina*, respetivamente. A análise sensorial revelou que os provadores preferiram as bolachas com incorporação de *Spirulina* em particular a com 2%.

Palavras-chave: Bolachas; Microalgas; Cor; Reologia; Análise sensorial.

Abstract

Microalgae are able to enhance the nutritional content of conventional foods and positively affect human health, due to their potential as source of bioactive compounds. The aim of this study was the development of sweet biscuits enriched with different concentrations (2% and 6% w/w) of microalgae biomass: *Arthrospira platensis* F&M-C256, *Chlorella vulgaris* Allma, *Tetraselmis suecica* F&M-M33 and *Phaeodactylum tricornutum* F&M-M40. The texture, colour and water activity of biscuits were evaluated over eight weeks and no significant differences were found in color and texture ($p < 0.05$) of the analysed samples. All biscuits showed water activity values below 0.5 after eight weeks storage. *Spirulina* biscuits (6%) presented the highest hardness, in response to simple penetration tests. The rheological characterization of the doughs (before cooking) has also revealed that this sample had the highest values for viscosity and viscoelastic moduli (G' and G''). Consequently, using 6% *Spirulina*, it is possible to reduce the flour content from 49% to 37% (w/w), maintaining viscoelastic properties similar to the control cookie dough. The results obtained in chemical composition analysis showed that protein content was the parameter which exhibited the most significant differences ($p < 0.05$), with 6% *Spirulina* and *Chlorella* biscuits exhibiting higher protein content (7,8-8,0%) in comparison to the control (4,9%). Phycocyanin content was 172 mg/kg and 363 mg/kg for 2% and 6% *Spirulina* biscuits. Sensory analysis revealed that 2% *Spirulina* biscuits had higher acceptance scores by the panellists.

Keywords: Biscuits; Microalgae; Color; Rheology; Sensory analysis.

Índice

Agradecimentos	II
Resumo	IV
Abstract	V
Capítulo 1 - Introdução	1
Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica	3
2.1. Desenvolvimento de produtos funcionais	3
2.2. Microalgas	4
2.2.1 Características gerais	4
2.2.2 Compostos bioativos presentes nas microalgas	5
2.2.3 Cultivo das microalgas	9
2.2.4 Aplicações das microalgas	10
2.2.5 Microalgas utilizadas no presente trabalho	11
2.3. Bolachas	15
2.3.1 Principais Ingredientes utilizados no fabrico de bolachas	15
2.3.2 Caracterização das bolachas	18
Capítulo 3 - Materiais e Métodos	21
3.1. Materiais	21
3.2. Métodos	21
3.2.1 Estudos de absorção de água e óleo das microalgas e da farinha	21
3.2.2 Preparação das bolachas	22
3.2.3 Medição instrumental da cor	23
3.2.4 Avaliação da textura das bolachas	25
3.2.5 Caracterização reológica das massas	25
3.2.6 Determinação da atividade da água das bolachas	27
3.2.7 Caracterização físico-química das bolachas	27
3.2.8 Análise sensorial das bolachas	30
3.2.9 Análise estatística	31

Capítulo 4 - Resultados e Discussão	32
4.1. Caracterização das matérias-primas	32
4.1.1 Avaliação da composição química da farinha de trigo e das microalgas	32
4.1.2 Avaliação do índice de absorção de água e óleo da farinha e das microalgas	33
4.2. Análise da massa e das bolachas	35
4.2.1 Aspeto geral das bolachas	35
4.2.2 Avaliação da cor das massas e das bolachas	35
4.2.3 Avaliação da textura das bolachas	43
4.2.4 Avaliação do comportamento reológico das massas	46
4.2.5 Avaliação da atividade da água.....	50
4.2.6 Avaliação das características químicas	52
4.2.7 Avaliação do teor de ficocianina e aloficocianina na massa e nas bolachas com <i>Spirulina</i>	54
4.2.8 Análise sensorial das bolachas	55
Capítulo 5 - Conclusões e Proposta de trabalho futuro	59
Referências bibliográficas	61
Anexos	VI

Índice de figuras

Figura 1 - Sistema de cultivo aberto	9
Figura 2 - Fotobiorreactores tubulares e em painel.....	10
Figura 3 - <i>Spirulina platensis</i>	12
Figura 4 - <i>Chlorella vulgaris</i>	13
Figura 5 - <i>Tetraselmis suecica</i>	14
Figura 6 - <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	14
Figura 7 - Circulo cromático CIE L*a*b	18
Figura 8 - Teste de varrimento de tensões.	19
Figura 9 - Teste de varrimento de frequências	20
Figura 10 - Curvas de escoamento e respectivas curvas de viscosidade	20
Figura 11 - Preparação das bolachas com 2% de microalga (F2).....	23
Figura 12 - Colorímetro <i>Minolta CR-400</i>	24
Figura 13 - Texturómetro TA-XT plus (a) e texturograma com a macro aplicada (b).....	25
Figura 14 - Reómetro de tensão controlada Haake RS-75 (a) e Reómetro de tensão controlada <i>MARS III - Haake</i> (b).....	26
Figura 15 - Medidor de aw HygroPalm HP23-AW.....	27
Figura 16 - Medidor de humidade PMB 202.	Erro! Marcador não definido.
Figura 17 - Extratos de ficocianina referentes às amostras	29
Figura 18 - Exemplo de forma de apresentação das amostra para análise sensorial.	30
Figura 19 - Índice de absorção de água para a farinha, microalgas e farinha + microalgas a 20°C e 90°C.	33
Figura 20 - Capacidade de absorção de óleo para a farinha, microalgas e farinha + microalgas a 20°C.	34
Figura 21 - Bolachas desenvolvidas.	35
Figura 22 - Comparação dos parâmetros L*, a*, b*, C* e h° das bolachas com 2% e 6% de microalga e da bolacha controlo na semana 0.	36
Figura 23 - Localização no espaço bidimensional da cor da massa e da bolacha com 2% e 6% de microalga na semana 0.	38
Figura 24 - Comparação do parâmetros L* e h° da massa e da bolachas controlo e com incorporação de 2% e 6% das diferentes microalgas na semana 0.	39
Figura 25 - Parâmetros L*, a* e b* obtidos para a bolacha controlo e para as bolachas com incorporação de 2% e 6% e microalga ao longo do tempo	41
Figura 26 - Parâmetros C* e h° obtidos para a bolacha controlo e para as bolachas com incorporação de 2% e 6% de microalga ao longo do tempo.	42

Figura 27 - Comparação do trabalho realizado pela sonda na bolacha controle e nas bolachas com incorporação de 2% e 6% das diferentes microalgas na semana 0.	43
Figura 28 - Comparação da firmeza das bolachas com incorporação de 2% e 6% das diferentes microalgas na semana 0.	44
Figura 29 - Variação do Trabalho realizado pela na bolacha controle e nas bolachas com 2% de microalga ao longo do tempo.	45
Figura 30 - Variação do Trabalho realizado pela na bolacha controle e nas bolachas com 6% de microalga ao longo do tempo.	46
Figura 31 - Espectros mecânicos das massas das formulações F1, F2 e F3 utilizando <i>Spirulina</i>	47
Figura 32 - Espectros mecânicos das formulações F1 e com 6% de <i>Spirulina</i> e diferentes concentrações de farinha: F3, F4 e F5	48
Figura 33 - Valores de G' a 1 Hz para as formulações F1, F2, F3, F4 e F5.	48
Figura 34 - Curvas de escoamento para as massas com formulação F1, F2 e F3 utilizando <i>Spirulina</i>	49
Figura 35 - Curvas de escoamento para as massas com 6% de <i>Spirulina</i> e diferentes concentrações de farinha: F1, F3, F4 e F5.	49
Figura 36 - Variação da atividade da água das bolachas controle e com incorporação de 2% de microalga na semana 0 e na semana 8.	51
Figura 37 - Variação da atividade da água das bolachas controle e com incorporação de 6% de microalga na semana 0 e na semana 8.	51
Figura 38 - Quantidade de Ficocianina (a) e Aloficocianina (b) presente na massa e na bolacha com 2% e 6% de <i>Spirulina</i>	54
Figura 39 - Resposta dos provadores (n=40) quanto às bolachas com 2% e 6% de <i>Chlorella</i> e de <i>Spirulina</i>	56
Figura 40 - Resposta dos provadores (n=40) quanto às bolacha com 2% e 6% de <i>Chlorella</i> e de <i>Spirulina</i>	57
Figura 41 - Respostas dos provadores (n=40) relativamente à intenção de compra das bolachas.	58

Índice de tabelas

Tabela 1 - Formulações das bolachas desenvolvidas.	23
Tabela 2 - Composição química da farinha de trigo e das microalgas utilizadas na formulação das bolachas (% , m/m).	32
Tabela 3 - Variação de cor entre as bolachas com 2% e 6% de microalga analisada na semana 0.	37
Tabela 4 - Variação de cor entre as massas e as bolachas controlo e com 2% e 6% de microalga analisada semana 0.	40
Tabela 5 - Variação de cor analisada na bolacha controlo e nas bolachas com 2% de microalga ao longo do tempo (em relação à cor da semana 0).	42
Tabela 6 - Variação de cor analisada na bolacha controlo e nas bolachas com 6% de microalga ao longo do tempo (em relação à cor da semana 0).	42
Tabela 7 - Composição química das bolachas controlo e com incorporação de 2% e 6% de microalga.....	53

Capítulo 1 - Introdução

Nos últimos anos tem-se verificado uma alteração no estilo de vida e nos hábitos alimentares por parte da população. Essas alterações desencadearam a investigação e o desenvolvimento de produtos funcionais devido aos benefícios específicos que estes podem trazer para a saúde (Plaza et al., 2009).

As microalgas são uma fonte inesgotável de compostos naturais que podem ser utilizados como ingredientes funcionais (Gouveia et al., 2008a; Plaza et al., 2009; Batista et al., 2013). A composição bioquímica destas pode ser manipulada alterando as condições do meio de cultura e provocando *stress* ambiental de modo a induzir a produção e acumulação de concentrações elevadas de biocompostos de interesse (Vaz et al., 2016). As microalgas não necessitam de terra arável, não competindo desta forma com culturas alimentares, não requerem água potável, o que é extremamente importante pois permite a utilização de resíduos industriais para o seu crescimento (Vaz et al., 2016). Estes microrganismos conseguem duplicar a sua biomassa num período entre 2 a 5 dias, atingindo elevados rendimentos sem a necessidade de aplicação de pesticidas, fungicidas e herbicidas (Costa & Morais, 2011).

As bolachas são dos produtos de pastelaria mais consumidos em todo o mundo. Este facto deve-se ao seu sabor, versatilidade, conveniência, fácil conservação, textura e aparência (Gouveia et al., 2008 b). Uma forma de tornar este produto mais saudável e ainda mais atrativo é a sua preparação recorrendo à incorporação de produtos naturais tais como a biomassa microalgal (Gouveia et al., 2008 b).

O presente trabalho foi desenvolvido em colaboração com o Departamento de Produção Agro - Alimentar e Ciências Ambientais (DISPAA) da Universidade de Florença (Itália), de acordo com a parceria estabelecida com o Instituto Superior de Agronomia, e teve como principal objetivo o desenvolvimento de bolachas doces, similares às tradicionais bolachas de manteiga, com incorporação de quatro microalgas: *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis*, *Tetraselmis suecica* e *Phaeodactylum tricornutum*. Foram estudadas duas concentrações: 2% (m/m), utilizada normalmente em produtos com incorporação de microalgas (Raymundo et al., 2005; Gouveia et al., 2007) e 6% (m/m), significativamente mais elevada de modo a

promover os efeitos benéficos das microalgas. Avaliou-se a textura, cor e atividade da água ao longo de 8 semanas de armazenamento bem como a composição química das bolachas (humidade, cinza, gordura, proteína e ficocianina (nas bolachas com *Spirulina*)). Foi ainda realizado o estudo do comportamento reológico das massas das bolachas controlo e com incorporação de *Spirulina*. Por fim, avaliou-se sensorialmente as bolachas com incorporação de *Chlorella* e *Spirulina*.

A presente tese divide-se em cinco capítulos. A introdução apresenta uma contextualização geral do trabalho bem como os objetivos do mesmo. O capítulo 2 compreende uma revisão bibliográfica sobre os principais temas relacionados com o tema da tese. Nos capítulos 3 e 4 apresentam-se os materiais e métodos e os resultados e discussão dos mesmos, respetivamente. No quinto e último capítulo encontram-se as principais conclusões do trabalho, bem como sugestões para trabalhos futuros.

Alguns dos resultados deste trabalho foram já apresentados num Workshop no âmbito da Ação COST ES1408 EUALGAE (*“European Network for Algal Bioproducts”*). Recentemente foi também submetido um resumo para apresentação no Congresso Anual da Associação Europeia de Biomassa Algal (EABA) a realizar-se em Dezembro de 2016 (*AlgaEurope 2016*). Os respetivos resumos dos trabalhos referenciados encontram-se no anexo 1:

- Batista AP, Fradinho P, Fragoso S, Graça C, Sousa I, Raymundo A (2016). Developing Microalgal Food Bioproducts – rheological approach for bakery products. *1st EUALGAE Workshop for Early Career Investigators on Algal Bioproducts* (COST Action ES1408). P.9. (Valladolid, Espanha, 4 de Abril) (Comunicação Oral)
- Batista AP, Niccolai A, Fradinho P, Fragoso S, Sousa I, Raymundo A, Rodolfi L, Biondi N, Tredici MR. Microalgae biscuits – sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and *in-vitro* digestibility. Submetido ao AlgaEurope 2016. (Madrid, Espanha, 13 a 15 de Dezembro) (Comunicação Oral)

Adicionalmente, está também a ser preparado um artigo científico, para submeter a uma revista internacional, conjugando os resultados obtidos pela equipa do ISA e pela equipa do DISPAA da Universidade de Florença.

Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica

2.1. Desenvolvimento de produtos funcionais

Nos últimos anos, tem-se vindo a verificar um interesse crescente no desenvolvimento de produtos funcionais devido aos seus efeitos benéficos na saúde. O aumento da procura deste tipo de produtos deve-se ao aumento dos custos de saúde, ao desejo das pessoas mais idosas de melhorar a sua qualidade de vida e ao aumento da esperança média de vida (Plaza et al., 2009).

O conceito de alimento funcional nasceu no Japão no início dos anos 80, com o objetivo de proteger a saúde dos consumidores e reduzir os elevados custos públicos na saúde. Um alimento é considerado "funcional" se for devidamente demonstrado que pode afetar benéficamente uma ou mais funções do organismo humano, melhorando a saúde e o bem-estar ou reduzindo o risco de algumas doenças. O efeito destes alimentos provém de um ou mais ingredientes funcionais presentes na sua composição (Plaza et al., 2009). Em 1993, o ministério da saúde e do bem-estar estabeleceu uma política para "alimentos para usos específicos de saúde" pelo que as alegações de saúde de alguns alimentos funcionais selecionados foram legalmente permitidas e regulamentadas.

Em 2006, a EFSA (Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar) adotou o Regulamento (CE) nº.1924/2006 sobre a utilização de alegações nutricionais e de saúde para os alimentos. Segundo este regulamento uma alegação nutricional é aquela que afirma ou sugere que um dado alimento tem propriedades nutricionais benéficas e uma alegação de saúde é aquela que declara, sugere ou implica a existência de uma relação entre uma dada categoria de alimentos, um alimento ou um dos seus constituintes e a saúde. Um dos principais objetivos deste regulamento é garantir que qualquer alegação feita num rótulo de produtos alimentares na União Europeia seja clara e comprovada através de provas científicas, para que não existam dúvidas quanto à sua veracidade e de modo a proteger os consumidores.

Nos Estados Unidos da América, a FDA (Food and Drugs Administration) aceitou a correlação entre alguns nutrientes utilizados na alimentação e a possibilidade de prevenir várias doenças (Plaza et al., 2009).

As microalgas são uma das fontes mais promissoras de compostos naturais tais como pigmentos, ácidos gordos, vitaminas, proteínas e polissacáridos, que podem ser utilizados como ingredientes funcionais (Batista et al., 2013). No entanto, não é só a presença de determinados compostos de elevado valor nutricional que faz destes

microrganismos interessantes, mas também a sua enorme diversidade e a possibilidade de manipular a sua composição bioquímica alterando as condições de cultivo (temperatura, pH, salinidade e disponibilidade de nutrientes) (Vaz et al., 2016).

2.2. Microalgas

2.2.1 Características gerais

As microalgas são microrganismos unicelulares fotossintéticos, eucarióticos ou procarióticos (Cardoso et al., 2010). São responsáveis por mais de 50% da produtividade fotossintética primária da terra (Milledge, 2011) e crescem em água doce, salobra e salgada, podendo também utilizar efluentes e águas residuais (Semião, 2013). As microalgas são classificadas de acordo com a sua cor: classe *chlorophyceae* - algas verdes, classe *rhodophyceae* - algas vermelhas, classe *cyanophyceae* - algas azuis e classe *phaeophyceae* - algas castanhas (Begun et al., 2016) e constituem a base da cadeia alimentar nos sistemas aquáticos, formando o fitoplâncton (Mercado, 2011).

As microalgas possuem estruturas simples, sendo constituídas basicamente por hidratos de carbono, proteínas, lípidos e vitaminas tais como vitamina A, B1, B2, B6, C e E (Mercado, 2011). A composição bioquímica destes microrganismos pode ser manipulada, alterando as suas condições de cultivo (meio, luz, temperatura, salinidade, pH, CO₂) e submetendo-as a condições de stress de modo a induzir a produção de elevadas concentrações de compostos bioativos de interesse (Vaz et al., 2016).

A produção destes microrganismos não é sazonal e não requer terras aráveis, não competindo com outras culturas alimentares. Apresentam elevada taxa de crescimento, duplicando a sua biomassa num período entre dois a cinco dias sem a utilização de pesticidas, fungicidas e herbicidas (Costa & Morais, 2011). Têm a capacidade de fixar o CO₂ atmosférico de forma dez vezes mais eficiente do que as plantas superiores (Mostafa, 2012), reduzindo desta forma o efeito de estufa, o aquecimento global e as mudanças climáticas (Gouveia et al., 2008a), o que é uma característica bastante importante hoje em dia, tendo em conta o Acordo de Paris aprovado por 195 países em Dezembro de 2015. Este acordo é o primeiro pacto universal para o combate contra as mudanças climáticas e o aquecimento global e tem como principal objetivo manter o aumento da temperatura média global abaixo dos 2°C, reduzindo as emissões de gases com efeito de estufa.

2.2.2 Compostos bioativos presentes nas microalgas

As microalgas são uma potencial fonte de uma vasta gama de compostos de alto valor biológico tais como ácidos gordos polinsaturados, pigmentos como clorofilas, carotenoides e ficobiliproteínas, polissacáridos, proteínas, entre outros, com aplicações na indústria alimentar, farmacêutica e cosmética. Quando submetidas a condições de stress tais como presença ou ausência de certos nutrientes, intensidade da luz, pH, temperatura e salinidade, as microalgas sofrem alterações ao nível intracelular, sendo capazes de biossintetizar uma grande variedade de compostos, alguns com elevado interesse comercial. Deste modo, as microalgas podem ser consideradas como bioreatores naturais uma vez que podem crescer sob condições controladas específicas de modo a produzir e acumular, em grandes quantidades, alguns compostos bioativos (Batista, 2012).

2.2.2.1. Pigmentos

As microalgas são consideradas as principais fotosintetizadores existentes na terra, produzindo pigmentos como clorofilas a, b e c, carotenóides e ficobiliproteínas. Estes pigmentos melhoram a eficiência da utilização da luz solar por parte das microalgas e protegem-nas contra a radiação solar (Gouveia et al., 2008a). O teor destes compostos depende da espécie de microalga e das condições de cultivo da mesma. Como já referido anteriormente fatores como temperatura, pH, salinidade, luz, limitação de nutrientes, pesticidas e metais pesados afetam a produção deste tipo de compostos por parte das microalgas. Atualmente, existe uma utilização preferencial de corantes sintéticos nas indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética mas devido ao efeito nocivos associados a estes, têm havido um aumento da exploração das microalgas como fonte de corantes naturais (Begum et al., 2016).

Clorofilas

Todas as algas apresentam na sua constituição um ou mais tipos de clorofilas. A clorofila a, pigmento fotossintético primário, encontra-se presente em todas as algas, sendo o único tipo existente nas cianobactérias e nas rodófitas. A clorofila -b, está presente nas clorófitas e euglenófitas e as clorofilas -c, -d e -e são encontradas em algumas algas marinhas e em diatomáceas. As quantidades de clorofila presentes nas microalgas variam entre 0,5-1,5% do peso seco (Gouveia et al., 2008a, Batista, 2012). Além do seu uso como corante natural na indústria alimentar e farmacêutica, alguns derivados destes compostos conseguem apresentar efeitos benéficos para a saúde (Gouveia et al., 2008a).

Carotenóides

As microalgas contêm carotenoides, amarelos, laranjas e vermelhos (Milledge, 2011). Estes são os pigmentos responsáveis pelas diferentes cores dos frutos, vegetais e outras plantas (Gouveia et al., 2008a). Existem cerca de 400 carotenóides conhecidos, mas só alguns são usados comercialmente, com maior relevância para o β -caroteno e para a astaxantina (Milledge, 2011). Os carotenóides são utilizados principalmente como corantes naturais alimentares, como aditivos na alimentação animal e na indústria cosmética (Spolaore, et al., 2006). A concentração média destes pigmentos, na maioria das algas, varia entre 0,1-2%, havendo microalgas que sob condições de stress conseguem produzir até 14% de β -caroteno (Milledge, 2011). A importância nutricional e terapêutica de alguns carotenóides deve-se à sua capacidade de atuar como pró-vitamina A, isto é, podem ser convertidos em vitamina bem como às suas propriedades antioxidantes, que permitem captar os radicais livres, diminuindo o risco de doenças como arteriosclerose, cataratas, esclerose múltipla e alguns tipos de cancro (Spolaore et al., 2006; Guedes et al., 2011).

Ficobiliproteínas

As ficobiliproteínas são pigmentos fotossintéticos, profundamente coloridos, fluorescentes e solúveis em água, que se encontram em algumas microalgas tais como cianobactérias, rodófitas e criptófitas (Milledge, 2011). Existem três grandes tipos de ficobiliproteínas nomeadamente a ficocianina e a aloficocianina presentes na cianobactéria *Arthrospira* e a ficoeritrina presente na rodófito *Porphyridium* (Chu, 2012). Estas são largamente utilizadas como pigmentos naturais em produtos alimentares (pastilhas, gelados e geleias) e produtos de cosmética (batons, sombras para os olhos e eyeliners) e ainda como ferramentas de diagnóstico (marcadores fluorescentes) na investigação biomédica (Gouveia et al., 2008a; Chu, 2012). Além destas aplicações a ficocianina tem demonstrado propriedades anti-inflamatórias, anti-cancerígenas, neuroprotetoras, hepatoprotetoras, além das propriedades antioxidantes (Fernández-Rojas et al., 2014).

2.2.2.2. Ácidos Gordos Polinsaturados

Algumas microalgas marinhas são capazes de sintetizar e acumular ácidos gordos polinsaturados (PUFA) com particular interesse, nomeadamente ácido linolénico (GLA, 18:3 ω 6), ácido araquidónico (AA, 20:4 ω 6), ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 ω 3) e ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6 ω 3) (Gouveia et al., 2008a; Chu, 2012). Os seres humanos não possuem capacidade metabólica para sintetizar

ácido linoleico e ácido linolénico (ácidos gordos essenciais) em quantidades suficientes, pelo que estes têm de ser obtidos através da alimentação. Contudo conseguem sintetizar ácido araquidónico a partir de ácido linoleico e EPA e DHA a partir de ácido linolénico por dessaturação e alongamento da cadeia. Porém a capacidade metabólica dos seres humanos de converter ácido linolénico em EPA e DHA é limitada, principalmente quando existe um consumo abundante de ácido linoleico uma vez que ambos os ácidos gordos (ácido linoleico e ácido linolénico) são metabolizados pelo mesmo sistema enzimático, competindo entre si pelas Δ -6 e Δ -7 dessaturases, prevalecendo a formação do AA a partir do LA em detrimento da formação de EPA e DHA. (Rocha, 2015)

Atualmente, a maior fonte de ácidos gordos de cadeia longa ω 3, incluindo EPA e DHA são os óleos de peixe (Milledge, 2011). Uma fonte convencional de PUFA são os peixes e os óleos de peixe mas devido a problemas de contaminação com poluentes, metais pesados e toxinas, têm sido exploradas várias alternativas. Uma dessas alternativas é a produção de PUFA a partir de microalgas marinhas, uma vez que os ácidos gordos polinsaturados encontrados nos peixes são obtidos através da sua alimentação, que consiste em microalgas marinhas (Chu, 2012). O DHA é o único PUFA proveniente de microalgas disponível comercialmente, especificamente a partir do cultivo heterotrófico da diatomácea *Schizochytrium* sp. pela empresa Martek (EUA). O DHA é bastante importante para o correto funcionamento do cérebro e para o desenvolvimento da visão em crianças e a sua maior aplicação é como suplemento em fórmulas infantis e suplementos dietéticos (Milledge, 2011).

2.2.2.3. Proteínas

O elevado conteúdo proteico de várias espécies de microalgas e o seu perfil de aminoácidos, que se compara favoravelmente com a de outras proteínas alimentares, é uma das muitas razões pelas quais se consideram estes microrganismos como uma fonte não convencional de proteína (Becker, 2004; Lordan et al., 2011). A *Spirulina*, por exemplo, apresenta um elevado teor proteico que varia entre 60-70% dependendo da estirpe e não só possui todos os aminoácidos essenciais como estes apresentam elevada biodisponibilidade (Lordan et al., 2011). Além disso, o crescimento à escala industrial da microalga *Dunaliella*, permite obter uma produtividade 100 vezes maior do que na agricultura, em termos de proteína (Lordan et al., 2011). As proteínas provenientes de fontes marinhas mostram-se promissoras como ingredientes funcionais uma vez que possuem propriedades únicas como películas, capacidade de formação de espumas e géis e atividade antimicrobiana. Péptidos purificados provenientes da *Chlorella vulgaris* têm

demonstrado atividade protetora contra danos celulares. Uma das principais proteínas presentes na *Spirulina platensis* e na *Porphyridium* são as ficobiliproteínas cujos efeitos anti-inflamatório, antioxidante, anticancerígeno e hepatoprotetor têm sido descritos (Lordan et al., 2011).

2.2.2.4. Polissacáridos

Os polissacáridos microbianos dividem-se geralmente em três grupos, dependendo da sua localização na célula: polissacáridos constituintes da parede celular, polissacáridos de reserva e polissacáridos extracelulares ou exopolissacáridos (EPS) (Dewapriya & Kim, 2014). Os polissacáridos constituintes da parede celular são predominantemente celulose e por essa razão a incorporação de biomassa microalgal pode trazer problemas na sua digestibilidade/utilização, uma vez que os humanos não conseguem digerir-la (Becker, 2004). O amido e o β -1,3-glucano são os polissacáridos de reserva mais comuns presentes nas microalgas, podendo estar presentes em concentrações até 50% (Batista, 2012). Os EPS são produtos de elevado valor comercial e apresentam vantagens relativamente aos polissacáridos provenientes de plantas devido às suas funções e à sua estabilidade química e física (Dewapriya & Kim, 2014). A microalga mais promissora para a obtenção destes produtos é a *Porphyridium cruentum* que produz um exopolissacárido sulfatado que pode substituir a carragenina em várias aplicações (Gouveia et al., 2008a).

2.2.2.5. Vitaminas e Minerais

As microalgas são um excelente fonte de uma grande parte das vitaminas essenciais, tais como vitamina A, tiamina (B_1), riboflavina (B_2), ácido pantoténico (B_5), piridoxina (B_6), biotina (B_7), ácido fólico (B_9), vitamina B12, vitamina C e vitamina E (Dewapriya & Kim, 2014; Vaz et al., 2016). São também uma valiosa fonte de minerais contendo sódio (Na), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e ferro (Fe) (Becker, 2004). Os elevados níveis de vitamina B_{12} e ferro de algumas microalgas, como a *Spirulina*, fazem dela muito interessante como suplemento nutricional para vegetarianos (Batista, 2012). O conteúdo vitamínico presente em cada microalga depende do seu genótipo e das condições em que é cultivada (Dewapriya & Kim, 2014).

2.2.3 Cultivo das microalgas

Os sistemas de cultivo de microalgas podem variar entre autotrófico ou fotoautotrófico e heterotrófico (menos comum). O cultivo autotrófico é aquele que utiliza a luz como fonte de energia e dióxido de carbono como fonte de carbono. No cultivo heterotrófico, a fonte de energia e de carbono é exclusivamente carbono orgânico (Cardoso et al, 2011). Relativamente aos tipos de reatores utilizados no cultivo de microalgas, a produção de microalgas heterotróficas é realizada em bioreatores convencionais (fermentadores), já o cultivo de microalgas autotróficas por ser feito em sistemas abertos (Figura 1) ou fotobiorreatores (sistemas fechados) (Semião, 2013). O uso de sistemas de cultivo aberto é bastante comum. Estes apresentam baixo custo de construção, têm fácil manutenção e a energia necessária é bastante reduzida (Mercado, 2011). Por outro lado, a produtividade é muito mais baixa quando comparado com os sistemas fechados pois não existe controlo adequado das condições de cultura (intensidade da luz, temperatura, pH, etc.). Existe ainda a possibilidade de contaminação e ataques de predadores e o sistema de agitação pode ser deficiente, não garantindo a homogeneização da cultura nem a difusão ótima do dióxido de carbono para o meio (Mercado, 2011; Semião 2013).



Figura 1 - Sistema de cultivo aberto (Fonte: <http://blog.watershed.net/wp-content/uploads/2014/05/chlorella-pond2.jpg>).

O uso de fotobiorreatores (Figura 2) permite o cultivo sob condições controladas e a prevenção de agentes contaminantes. Contudo, estes sistemas apresentam um elevado custo inicial, de operação e manutenção e são muito específicos para a espécie de microalga que se pretende cultivar (Mercado, 2011). Os fotobiorreatores podem apresentar forma tubular ou em painel (*flat-plate*). Os fotobiorreatores tubulares são normalmente constituídos por vidro ou plástico e apresentam-se num conjunto de tubos transparentes com um diâmetro inferior a 10 cm. Embora este sistema apresente boas produtividades, está sujeito à acumulação

de concentrações elevadas de oxigénio, ao sobreaquecimento da cultura e à formação de gradientes de pH. Os fotobiorreactores em painel são constituídos por finos painéis de vidro, acrílico ou PVC, entre os quais circula a cultura de microalgas. O ar é injetado pela base, fornecendo o CO₂ necessário à cultura e criando turbulência para homogeneizar a luminosidade captada por todas as células. Estes fotobiorreactores apresentam várias vantagens tais como baixo consumo de energia, alta capacidade de transferência de massa, baixa acumulação de oxigénio e alta eficiência fotossintética (Semião, 2013). Na Universidade de Florença e sua empresa *spin-off* Fotosintética & Microbiológica s.r.l., o grupo liderado pelo Professor Mário Tredici, desenvolveu um tipo de fotobiorreactor planar denominado *Green Wall Panel* (GWP®) composto por mangas de polietileno num suporte metálico. Este suporte tem capacidade de se inclinar e girar ao longo do dia de forma a maximizar a captação de luz solar e consequentemente otimizar a capacidade fotossintética e produtividade de biomassa (Tredici et al, 2015).

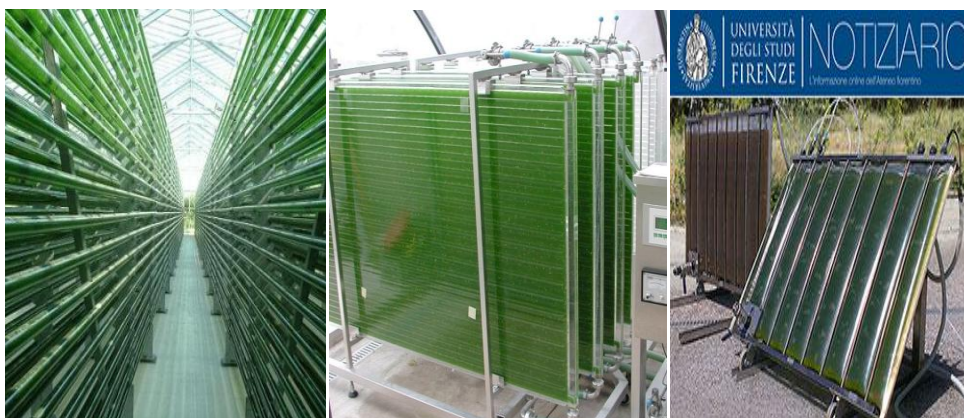


Figura 2 - Fotobiorreactores tubulares(Fonte:<https://www.biodieselbr.com/noticias/colunistas/gazzoni/desafios-biodiesel-algas-060212.htm>) e em painel (Fonte: <https://acuiculturamarina.com/2015/02/11/piensos-animales-con-algas/>).

2.2.4 Aplicações das microalgas

A biotecnologia das microalgas têm sido utilizada para diferentes aplicações comerciais em diversos sectores como o alimentar, farmacêutico, cosmético e energético (Abu-Ghosh et al., 2016).

Devido à sua composição química, as microalgas são largamente utilizadas na indústria alimentar como suplemento alimentar e corante natural. As quatro espécies mais utilizadas são *Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella salina* (para obtenção de β -caroteno) e *Haematococcus pluvialis* (para obtenção de astaxantina) (Vaz et al., 2016). Atualmente, as microalgas podem ser encontradas comercialmente sob a forma de cápsulas, pós, líquidos e comprimidos (Spolaore et al., 2006), ou ser incorporadas em alimentos tradicionais tais como massas (Fradique et al., 2010; 2013; De Marco et al.,

2014;), bolachas (Gouveia et al., 2007; 2008b), pão, snacks salgados, iogurtes, doces e bebidas (Spolaore et al., 2006), promovendo os efeitos saudáveis associados à biomassa de cada microalga. Apesar do seu elevado conteúdo nutricional, a incorporação deste material em alimentos convencionais ainda não ganhou importância significativa devido a fatores como a consistência da biomassa seca, a cor verde escura e o ligeiro cheiro a peixe (Becker, 2004).

Além do uso na alimentação humana, as microalgas são também uma importante fonte de alimento e de suplemento alimentar para vários animais aquáticos. Cerca de 30% da produção mundial de microalgas é vendida para ser usada em alimentação animal (Spolaore et al., 2006; Milledge, 2011).

Algumas espécies de microalgas, como a *Spirulina* e a *Chlorella* apresentam um papel importante na indústria cosmética mais propriamente em cuidados de pele. Algumas empresas cosméticas como a Moët Hennessy Louis Vuitton (LVMH), investiram no seu próprio sistema de produção de microalgas. Vários extratos de microalgas podem ser encontrados em produtos faciais e de cuidados de pele, estando já disponíveis comercialmente dois produtos cujas propriedades foram demonstradas: um extrato rico em proteínas provenientes da *Spirulina* que repara os sinais de envelhecimento precoce da pele e um extrato de *Chlorella vulgaris* que estimula a síntese de colagénio na pele, aumentando a regeneração dos tecidos e reduzindo as rugas (Spolaore et al., 2006).

As microalgas podem ainda ser utilizadas como matéria-prima para a produção de biodiesel, uma vez que possuem uma maior concentração e maior produtividade de lípidos do que as matérias-primas usadas tradicionalmente e não comprometem a área agrícola destinada a outras culturas alimentares (Chu, 2012). O teor lipídico das microalgas pode variar entre 16 a 68% de peso seco, podendo alcançar valores mais elevados, manipulando as condições de cultivo. Por exemplo, algumas microalgas são capazes de acumular lípidos até 70% do seu peso seco quando na ausência de azoto (Chu, 2012). No entanto, para que a utilização de microalgas na produção de biodiesel seja viável económica e ambientalmente, o processo de obtenção de microalgas deve ser o mais produtivo e com o menor custo possível (Cardoso et al., 2011).

2.2.5 Microalgas utilizadas no presente trabalho

A utilização de microalgas na alimentação humana a nível Europeu está sujeita ao Regulamento (EC) Nº 258/97 relativo a novos alimentos e ingredientes alimentares. Através deste regulamento a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) garante que novos alimentos que venham a ser introduzidos nos

estados membros são sujeitos a um processo de avaliação da segurança alimentar de forma a proteger a saúde pública. As microalgas *Chlorella* e *Spirulina* não necessitam de passar por este procedimento, na medida em que já eram consideradas como fonte alimentar segura antes deste regulamento ter sido implementado (1997). A empresa Fitoplancton Marino (Cádiz, Espanha) viu recentemente ser aprovada uma candidatura da microalga *Tetraselmis chuii* como “*Novel Food*” pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) de acordo com o este regulamento. Relativamente à *Phaeodactylum* ainda não existe nenhuma candidatura nesse sentido. No entanto dada a sua interessante composição bioquímica, e considerando os resultados de ensaios de toxicidade *in vitro* realizados pelo grupo da Universidade de Florença (Niccolai et al., 2016) decidiu-se também estudar a sua incorporação nas bolachas.

Arthrosphira (Spirulina) platensis

A *Arthrosphira platensis* é uma cianobactéria procariótica filamentosa (Figura 3) com um tamanho que pode alcançar os 0,5 mm e sem celulose na sua parede celular (Becker, 2004). É usualmente conhecida como *Spirulina*, que se refere maioritariamente a duas espécies: *A. maxima* e *A. platensis* (Gershwin & Belay, 2008). Esta microalga cresce naturalmente em certos lagos alcalinos com elevados valores de pH e elevadas concentrações de sais no, México e em África, e tem sido utilizada como alimento básico pelas populações locais desde os tempos mais ancestrais (Batista et al., 2013). É extensivamente produzida por todo o mundo (3000 ton/ano), e amplamente usada na alimentação e em suplementos (Bishop & Zubeck, 2012), devido ao seu elevado conteúdo proteico (até 70% em peso seco), cuja composição em aminoácidos apresenta grande interesse pois possui todos os aminoácidos essenciais e estes apresentam grande biodisponibilidade (Plaza et al., 2009) e devido ao seu excelente valor nutritivo (fonte de vitamina B12, ácido linolénico, β -caroteno e ficocianina) (Batista et al., 2013).

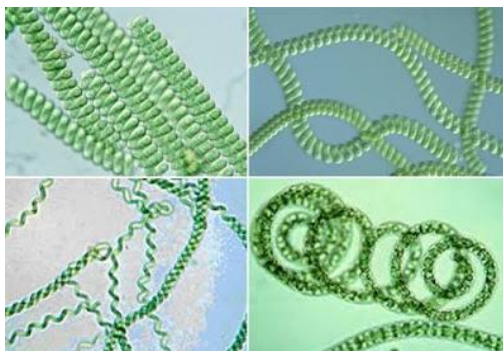


Figura 3 - *Spirulina platensis* (Fonte: <http://deskuenviis.nic.in/extension.asp>).

Chlorella vulgaris

A *Chlorella vulgaris* é uma microalga eucariótica unicelular esférica (Figura 4) com um diâmetro que varia entre 5 a 10 µm e cuja parede celular é constituída por hemicelulose, tornando as suas células rígidas (Becker, 2004). Esta microalga pertence à família das clorófitas (algas verdes), apresentando na sua constituição clorofila *a* e *b* (Plaza et al., 2009) e desde os tempos mais ancestrais que é utilizada como medicina alternativa e como alimento no Oriente (Batista et al., 2013). A produção comercial desta microalga como alimento funcional começou no Japão na década de 60 e hoje em dia é largamente produzida e comercializada em vários países, incluindo China e Estados Unidos da América, como suplemento alimentar para humanos e animais e em aquacultura, com uma produção estimada de cerca de 2000 ton/ ano (Batista, 2012).

O valor nutricional da *Chlorella* deve-se sobretudo ao elevado conteúdo proteico (51-58% em peso seco), aos vários carotenóides (α -caroteno, β -caroteno e luteína (Plaza et al., 2009) e a uma vasta gama de vitaminas (Chu, 2012). Além disso, esta microalga contém β -glucano que funciona como imunoestimulador captando os radicais livres e reduzindo a quantidade de lípidos no sangue (Spolaore et al., 2006).

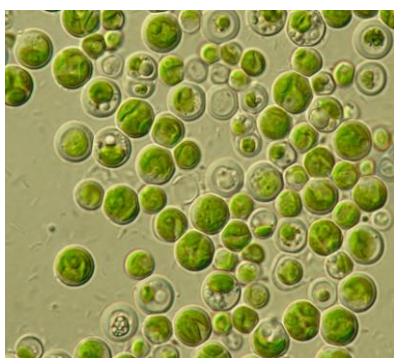


Figura 4 - *Chlorella vulgaris* (Fonte: http://botany.natur.cuni.cz/algo/CAUP/H1917_Chlorella_vulgaris.htm).

Tetraselmis suecica

A *Tetraselmis suecica* é uma microalga marinha unicelular flagelada (Figura 5) pertencente à família das clorófitas (algas verdes). As suas células são verdes brilhantes, móveis, ovoides e achatadas lateralmente com cerca de 10 µm de diâmetro e apresentam parede celular celulósica. Esta microalga é considerada como o microrganismo flagelado mais fácil de cultivar em grande escala (Mercado, 2011) e é amplamente utilizada em aquacultura como alimento vivo para larvas de moluscos, crustáceos e peixes. É considerada uma excelente fonte de ácidos gordos

polinsaturados. Além de rica em proteínas e hidratos de carbono, contem alfa-tocoferol (vit E), carotenoides e clorofila.



Figura 5 - *Tetraselmis suecica* (Fonte: <http://seahorsebreeder.co.uk/store/live-phytoplankton-culturing/836-tetraselmis-suecica>).

Phaeodactylum tricornutum

A *Phaeodactylum tricornutum* é uma diatomácea marinha unicelular castanha (Figura 6) com parede celular de sílica (Hamilton et al., 2014). É a única espécie do género *Phaeodactylum* que apresenta três formas diferentes: fusiforme (mais comum), oval e trirradial, mudando de forma devido a estímulos ambientais. Esta é uma das duas espécies de diatomáceas cujo genoma foi totalmente sequenciado, permitindo assim a sua modificação genética de modo a possibilitar um aumento da produtividade de alguns compostos de interesse (Kim et al., 2012). Esta microalga possui cerca de 30 a 45% de ácidos gordos polinsaturados, dos quais 20 a 40% são ácido eicosapentaenóico (EPA) (Fajardo et al., 2007), sendo por isso considerado uma ótima fonte deste ácido gordo ω -3 para produção comercial. Além disso, apresenta na sua composição clorofila -a e -c, carotenóides e fucoxantina (Hamilton et al., 2014). A fucoxantina é um carotenóide que confere coloração acastanhada às algas, que tem vindo a ser associado a vários benefícios para a saúde, nomeadamente efeito antioxidante, anti-diabético e anti-obesidade (Mikami & Hosokawa, 2013).

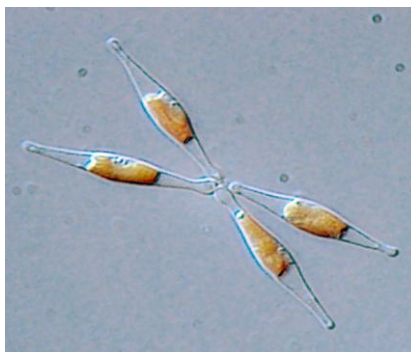


Figura 6 - *Phaeodactylum tricornutum* (Fonte; https://en.wikipedia.org/wiki/Phaeodactylum_tricornutum).

2.3. Bolachas

As bolachas são um dos produtos de pastelaria mais consumidos em todo o mundo devido ao seu sabor, versatilidade, conveniência, elevado período de conservação, textura e aparência (Gouveia et al. 2008b; Blaszczak et al., 2004). Adicionalmente, constituem uma fonte de energia devido ao seu elevado teor lipídico (Mieszkowska e Marzec, 2015).

Desta forma, existem no mercado bolachas fortificadas com uma série de ingredientes funcionais, desde antioxidantes, vitaminas e minerais, mas especialmente enriquecidos em fibras alimentares. O grupo de reologia alimentar do ISA tem vindo a desenvolver trabalho de investigação nesta área nos últimos anos, nomeadamente no estudo das implicações reológicas da adição de fibras em bolachas (Piteira, 2006). A utilização de psyllium, uma excelente fonte de fibra alimentar solúvel e insolúvel, foi também estudada com detalhe em bolachas (Raymundo et al., 2014) e outros alimentos. A utilização de biomassa de microalgas também já foi alvo de alguns estudos pelo grupo de reologia alimentar do ISA, em colaboração com o LNEG (ex-INETI) e o IPMA (ex-IPIMAR). Estudou-se a incorporação de *Chlorella vulgaris* (Gouveia et al., 2007) bem como de *Isochrysis galbana* (Gouveia et al., 2008b) tendo-se obtido colorações interessantes e um perfil de ácidos gordos rico em ómega 3 (EPA e DHA).

2.3.1 Principais Ingredientes utilizados no fabrico de bolachas

A estrutura das bolachas é largamente determinada pelos seus ingredientes, que são maioritariamente farinha (o seu conteúdo pode chegar a 50%), gordura (20 a 60%) e açúcar (25-55%). Simultaneamente apresentam um baixo teor de humidade (1-5%). Esta característica assegura uma baixa contaminação microbiológica e confere uma elevada *shelf-life* a este tipo de produtos (Wade, 1988; Mieszkowska & Marzec, 2015). As características reológicas e de textura das bolachas dependem da proporção dos ingredientes na formulação (Maache-Rezzoug et al., 1998; Raymundo et al., 2014).

Farinha

A farinha constitui o principal ingrediente das formulações das bolachas, fornecendo a matriz na qual os restantes ingredientes são misturados para formar a massa (Moraes et al., 2010). Normalmente a farinha utilizada é a de trigo. A

característica que mais a distingue das farinhas de outros cereais está relacionada com a presença de proteínas, nomeadamente gliadinas e gluteninas que formam uma rede viscoelástica capaz de reter o ar - o glúten. Na presença de água e na fase de amassadura dá-se uma quebra da estrutura quaternária das proteínas, ocorrendo posteriormente a ligação intermolecular entre elas mediante pontes de enxofre que estabilizam a rede de glúten (Carrilho, 2014).

Relativamente ao tipo de trigo utilizado, o trigo mole é mais adequado para a produção de bolachas do que o trigo duro uma vez que apresenta maior percentagem de amido danificado (Pareyt & Delcour, 2008). Este dano nos grânulos de amido facilita a sua hidratação e inchamento (entre 200 a 430% do seu peso), conduzindo a uma menor temperatura de gelatinização, bem como a um aumento da viscosidade das suspensões (Barrera et al., 2013).

A utilização de farinhas alternativas isentas de glúten, como farinha de arroz, milho e castanha tem vindo a ser investigada nos últimos anos (Carrilho, 2014) com vista ao desenvolvimento de produtos para celíacos (intolerantes ao glúten). A utilização destas farinhas acarreta desafios tecnológicos, uma vez que se torna difícil desenvolver massas com estruturas estáveis sem a rede de glúten, sendo necessário utilizar outros ingredientes e adjuvantes tecnológicos. A utilização de microalgas poderá contribuir para esse efeito estruturante.

Água

Tal como a farinha, a água tem um papel muito importante na formação de massa das bolachas, sendo necessária para solubilizar os outros ingredientes, para hidratar as proteínas que vão formar o glúten e para criar vapor durante a cozedura. Se a formulação não tiver água suficiente, as proteínas não vão hidratar adequadamente, originando uma massa pouco elástica. Por outro lado se a quantidade de água for excessiva obtém-se uma massa muito pegajosa (Pareyt & Delcour, 2008).

A dureza da água é um critério muito importante. Se a água for mole, isto é tiver poucos iões cálcio e magnésio, a massa produzida vai ser demasiado pegajosa. Se a água for dura o glúten formado é muito rígido. Uma água com uma dureza suave é a mais útil pois os iões reforçam a rede de glúten (Moraes et al., 2010).

Açúcar

O açúcar contribui para a textura, para o sabor e doçura, bem como para a cor das bolachas. A quantidade, a granulometria e o tipo de açúcar usado têm bastante influência na qualidade do produto (Moraes et al., 2010). O principal açúcar utilizado na formulação de bolachas é a sacarose, proveniente da cana-de-açúcar ou da beterraba sacarina. A adição de açúcar torna as bolachas frágeis uma vez que controla a hidratação e tende a dispersar a proteína e o amido, impedindo desta forma a formação de uma massa contínua. O aumento da concentração de açúcar na massa das bolachas pode ter efeitos estruturais negativos devido à competição entre o açúcar adicionado e a disponibilidade de água no sistema (Maache-Rezzoug et al., 1998). Por outro lado, a menor disponibilidade de água destas massas ajuda na preservação do produto ao longo do tempo de prateleira, uma vez que não existem condições para o desenvolvimento microbiano.

Margarina

A adição de gordura à massa das bolachas tem como objetivo reduzir a quantidade de água necessária, melhorar o sabor e a cor bem como transmitir o aroma desejado. A gordura contribui para o aumento da plasticidade da massa, estabilização das bolhas de ar formadas durante a mistura, melhorar a aparência do produto e tornar as bolachas mais crocantes (Mieszkowska & Marzec, 2015). No entanto, gordura a mais na formulação pode impedir o desenvolvimento de glúten através da criação de um revestimento em torno das proteínas.

Os critérios para seleção da gordura a incorporar nas bolachas devem basear-se no aroma, textura, sabor residual, custo e necessidades nutricionais específicas. Neste trabalho foi selecionada a margarina, gordura vegetal com elevado teor de ácidos gordos polinsaturados, em alternativa à manteiga (rica em gordura saturada) tradicionalmente utilizada neste tipo de produtos.

Fermento Químico

O fermento químico é um produto composto por uma mistura de bicarbonato de sódio e sais ácidos que pela influência do calor e/ou humidade, reagem produzindo dióxido de carbono aumentando o volume e a porosidade das massas (Moraes et al., 2010).

2.3.2 Caracterização das bolachas

2.3.2.1. Avaliação instrumental da cor

A cor é uma das características sensoriais mais importantes para a aceitabilidade do produto por parte do consumidor. A avaliação instrumental da cor é feita recorrendo a um colorímetro acoplado a uma fonte de iluminação padrão, cujos resultados são dados em função do sistema CIE $L^*a^*b^*$. Este sistema cromático é o mais utilizado na indústria de todo o mundo, sendo definido com base nas propriedades físicas da luz e na compilação fisiológica do olho humano. Neste sistema, a cor é localizada no espaço através de três coordenadas retangulares: L^* que mede a variação da luminosidade que varia entre 100 (branco) e 0 (preto) e a^* e b^* que medem a cromaticidade, variando entre a cor verde ($-a^*$) e a vermelha ($+a^*$) e entre a cor azul ($-b^*$) e a amarela ($+b^*$). Além destas, existem ainda as coordenadas cilíndricas, em que a coordenada h° (*Hue-Angle*) corresponde ao ângulo da tonalidade e a C^* (*Chroma*) que define a saturação. O valor de saturação C^* , representa a distância do eixo de luminosidade (L^*) e inicia-se em zero no centro. O ângulo de tonalidade começa no eixo $+a^*$ e movimenta-se em sentido anti-horário e expressa-se em graus CIE (1978).

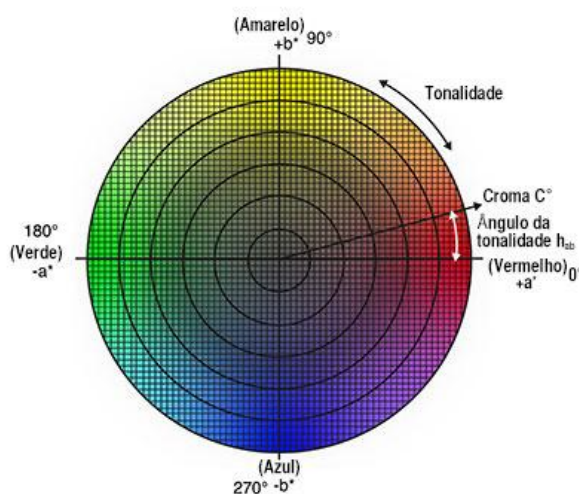


Figura 7 - Círculo cromático CIE $L^*a^*b^*$ (Fonte: Konica Minolta).

2.3.2.2. Avaliação da textura

A textura traduz um conjunto de propriedades físicas, percebidas sensorialmente e que são consequência da estrutura interna do material e influenciam a forma como sentimos o alimento. É um dos fatores decisivos na aceitabilidade dos produtos por parte dos consumidores (Bourne, 2002).

A avaliação da textura é realizada num texturómetro com células de carga (força aplicada ao material) de peso variável (5, 25 e 50 kg), sendo os equipamentos com células de carga maiores menos sensíveis para materiais menos firmes. A avaliação da textura ocorre através do uso de sondas que variam consoante o tipo de teste e alimento a analisar. No teste de penetração a sonda (de diâmetro menor que a amostra) entra no material e sai medindo-se assim a sua resistência à penetração.

2.3.2.3. Avaliação do comportamento reológico

A reologia é a ciência que estuda o escoamento (líquidos) e a deformação (sólidos) quando se exerce uma tensão num material. A avaliação das propriedades reológicas dos materiais é feita através de testes estáticos e testes dinâmicos ou oscilatórios. Nestes últimos aplica-se uma tensão ou deformação que varia sinusoidalmente com o tempo a uma determinada frequência. Estes são testes para baixas tensões/deformações e podem agrupar-se em: teste de varrimento de tensões, teste de varrimento de frequências, teste de varrimento de temperatura e teste de varrimento de tempo. No teste de varrimento de tensões (Figura 8), a tensão aplicada varia ao longo do tempo a um valor de frequência fixo. Estes testes têm como objetivo a determinação da zona de viscoelasticidade linear (gama de tensões para as quais G' - componente elástica e G'' - componente viscosa são independentes da tensão aplicada). Quando mais estruturado é o material maior é esta zona.

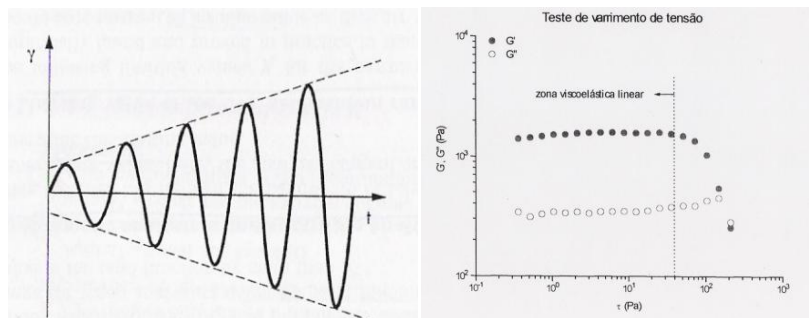


Figura 8 - Teste de varrimento de tensões (Metzger, 2002; Raymundo, 2003).

No teste de varrimento de frequências (Figura 9) é aplicada uma tensão constante (contida na zona de viscoelasticidade linear) e registam-se as variações de G' e G'' em função da frequência, para se obter o espectro mecânico. A tensão a aplicar ao material deve ser a necessária para que este corresponda ao requerido sem que haja uma destruição da sua estrutura interna, e nos permite compreender o tipo de ligações envolvidas na formação da sua estrutura tridimensional.

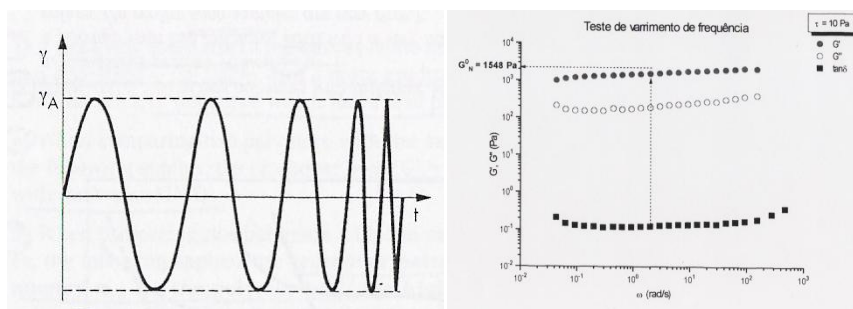


Figura 9 - Teste de varrimento de frequências (Metzger, 2002; Raymundo, 2003).

As curvas de escoamento representam a variação da viscosidade em função da velocidade de deformação aplicada. Um fluido newtoniano é aquele cuja viscosidade não varia com a velocidade de deformação. Um fluido reofluidificante é aquele cuja viscosidade diminui com o aumento da velocidade de deformação (à medida que uma determinada taxa de deformação é aplicada, a estrutura interna do material vai-se destruindo e por conseguinte a viscosidade diminui). Um fluido reoespessante é aquele cuja viscosidade aumenta com o aumento da velocidade de deformação (quando a velocidade de deformação aumenta, há uma reorganização molecular havendo agregação das moléculas e consequente aumento da viscosidade).

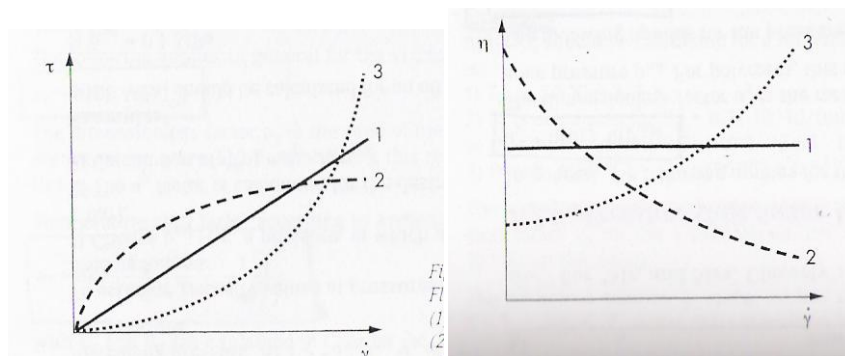


Figura 10 - Curvas de escoamento e respetivas curvas de viscosidade de fluidos Newtonianos (1), Reofluidificantes (2) e reoespessantes (3) (Metzger, 2002).

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

3.1. Materiais

Para a preparação das bolachas foram utilizadas as seguintes microalgas: *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* F&M-C256, *Chlorella vulgaris* Allma, *Tetraselmis suecica* F&M-M33 e *Phaeodactylum tricornutum* F&M-M40. A biomassa liofilizada destas microalgas foi fornecida pela Universidade de Florença, Departamento de Produção Agro - Alimentar e Ciências Ambientais (DISPAA), de acordo com a parceria estabelecida com o ISA. À exceção da *Chlorella vulgaris*, comercializada pela empresa Allma (Lisboa, Portugal), todas as restantes microalgas foram produzidas pela empresa Fotossintética & Microbiológica S.R.L. (Florença, Itália). A composição química da biomassa de microalgas foi fornecida pelo DISPAA - Universidade de Florença e apresenta-se na Tabela 2. Para facilitar a leitura, as microalgas utilizadas serão designadas neste documento como “*Spirulina*”, “*Chlorella*”, “*Tetraselmis*” e “*Phaeodactylum*”.

Os restantes ingredientes utilizados foram farinha de trigo com fermento para bolos (Nacional), açúcar branco de cana (Sidul), fermento químico em pó (Royal), margarina 59% de lípidos (Vaqueiro) e água destilada, adquiridos comercialmente.

3.2. Métodos

3.2.1 Estudos de absorção de água e óleo das microalgas e da farinha

Realizaram-se testes preliminares de absorção de água e óleo nas amostras de microalgas, bem como na farinha de trigo, e na proporção mais alta de 5 farinha: 1 microalga usada na preparação das bolachas. Pretendeu-se investigar o possível impacto que a introdução de microalga, e consequente substituição da farinha, poderia ter na massa das bolachas.

A determinação da capacidade de absorção de água e da solubilidade foram feitas de acordo com o método desenvolvido por Leach, McCowen & Schoch (1959). Este método envolve a suspensão da amostra (farinha (0,3g), microalga (0,3g) ou farinha: microalga (5:1 - 0,25g:0,05g), num volume conhecido de água (5mL), agitação a 20° C e a 90° C durante 30min. e centrifugação a 10 000g durante 10min. Após esse período, o sedimento resultante é pesado. A solubilidade da amostra (farinha, microalga ou farinha + microalga) é obtida através de secagem a 105°C do

sobrenadante resultante da centrifugação. As determinações foram realizadas em triplicado. O índice de absorção de água (IAA) é calculado através da equação 1.

$$IAA (g/g) = \frac{m_1}{m - m_2} \quad (1)$$

O índice de solubilidade (IS) é calculado através da equação 2.

$$IS (g/100g) = \frac{m_2}{m} \times 100 \quad (2)$$

Onde m_1 é a massa de sedimento após centrifugação (g), m_2 é a massa do resíduo no sobrenadante após evaporação (g) e m é a massa da amostra (g).

A determinação da capacidade de absorção de óleo foi feita de acordo com o método desenvolvido por Kaushal *et al.* (2012). Este método, tal como o anterior, envolve a suspensão da amostra (farinha (0,5g), microalga (0,5g) ou farinha: microalga (5:1 - 0,415g:0,085g), agitação a 350rpm a 20° C durante 1h e centrifugação a 5000g durante 25min. Após esse período, o óleo é retirado e o sedimento resultante é pesado. As determinações foram realizadas em triplicado. A capacidade de absorção de óleo (CAO) é calculada através da equação 3.

$$CAO (g/g) = \frac{m_2 - (m_1 + m)}{m} \quad (3)$$

Onde m_2 é a massa do tubo + resíduo após centrifugação (g), m_1 é a massa do tubo (g) e m é a massa da amostra (g).

3.2.2 Preparação das bolachas

As bolachas foram preparadas de acordo com uma formulação otimizada anteriormente pelo grupo de reologia do ISA (Gouveia *et al.*, 2008b), utilizando como ingredientes farinha de trigo, açúcar, fermento em pó, margarina, água e microalga. Na

Tabela 1 encontram-se as formulações utilizadas para as bolachas controlo (F1) bem como para as bolachas com incorporação de 2% (F2) e 6% (F3) de microalga. Estudaram-se mais duas formulações (F4 e F5) em que se incorporou 6% de *Spirulina* reduzindo-se o teor de farinha de modo a avaliar o efeito estruturante desta microalga na massa da bolacha (Tabela 1).

Tabela 1 - Formulações das bolachas desenvolvidas.

Ingredientes	F1 (controle)	F2	F3	F4	F5
	g/100g (%) [*]	g/100g (%)	g/100g (%)	g/100g (%)	g/100g (%)
Farinha de trigo	49	47	43	40	37
Açúcar	20	20	20	20	20
Margarina	20	20	20	20	20
Água destilada	10	10	10	10	10
Fermento em pó	1	1	1	1	1
Microalga	0	2	6	6	6

* As percentagens apresentadas são expressas em peso/peso (m/m).

Para a preparação das bolachas (Figura 11) usaram-se *batches* de 150g de massa. Pesou-se todos os ingredientes numa balança *Precisa BJ 1100D* e colocou-se os mesmos no robô de cozinha *Bimby Vorwerk* amassando na velocidade 4 durante 15s. Posteriormente moldou-se a massa utilizando um rolo, barras de acrílico com 4mm de espessura e uma forma circular com 48mm de diâmetro, de modo a obter bolachas o mais uniforme possível. Por fim colocou-se as bolachas num forno ventilado *Arianna-Unox* a 120 °C durante 40min. Após esse período, as bolachas foram arrefecidas até à temperatura ambiente e colocadas em recipientes fechados para análises posteriores.



Figura 11 - Preparação das bolachas com 2% de microalga (F2).

3.2.3 Medição instrumental da cor

A medição da cor das massas e das bolachas foi realizada diretamente sobre a superfície das mesmas, utilizando o colorímetro *Minolta CR-400* (Japão) (Figura 12), com uma fonte de iluminação padrão C e um ângulo visual de 2°, calibrado através de um padrão branco ($L^* = 94.61$; $a^* = -0.53$; $b^* = 3.62$).



Figura 12 - Colorímetro *Minolta CR-400* .

Os resultados foram expressos de acordo com o sistema CIELAB, onde L^* define a luminosidade que varia entre 0 e 100 (0 - preto e 100 - branco), a^* que varia de vermelho a verde ($-a^*$ - verde e $+a^*$ - vermelho) e b^* que varia de amarelo a azul ($-b^*$ - azul e $+b^*$ - amarelo). As medições foram realizadas à temperatura ambiente e sob luz artificial constante. Foram efetuadas 10 repetições de cada amostra ao longo de 8 semanas de armazenamento.

O parâmetro de cor C^* (*Chroma*) que define a intensidade da cor foi calculado com base na equação 4.

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (4)$$

O parâmetro de cor h° (*Hue-Angle*) que mede a tonalidade foi calculado a partir da equação 5.

$$h^\circ = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (5)$$

A diferença de cor (ΔE^*) entre as amostras de bolachas ao longo do tempo, entre as massas cruas e as bolachas cozinhadas e entre as bolachas com incorporação de 2% e 6% de microalga foi calculada com base equação 6.

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (6)$$

3.2.4 Avaliação da textura das bolachas

A textura das bolachas foi medida através da utilização do texturómetro TA-XT plus *Stable Micro Systems, UK* (Figura 13a), com uma célula de carga de 5 kg. Realizaram-se testes de penetração, utilizando uma sonda cilíndrica de aço inoxidável com 2 mm de diâmetro. Definiu-se a velocidade de teste a 1mm/s e a distância percorrida pela sonda a 3 mm. Dos texturogramas obtidos retirou-se a força máxima (N), correspondente à firmeza das bolachas, e a área abaixo da curva que corresponde ao trabalho de penetração realizado pela sonda (N*s) (Figura 13b). As medições foram realizadas à temperatura ambiente e sob luz constante. Foram efetuadas cerca de 10 repetições das medições para cada amostra durante 8 semanas de armazenamento.

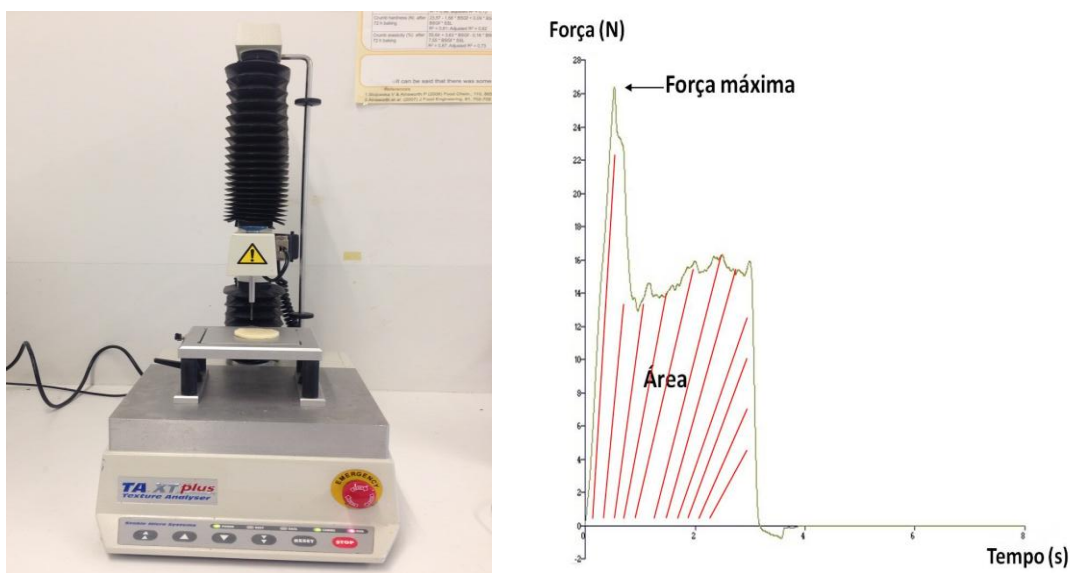


Figura 13 - Texturómetro TA-XT plus (a) e texturograma com a macro aplicada (b).

3.2.5 Caracterização reológica das massas

De modo a avaliar o efeito da incorporação de *Spirulina* no comportamento reológico das massas das bolachas, caracterizou-se, em termos reológicos, as massas das bolachas com *Spirulina* (F2, F3, F4 e F5), bem como a controlo (F1). Utilizou-se um reómetro de tensão controlada (Haake RS-75, Alemanha) (Figura 14a), com banho recirculador de controlo de temperatura (Haake DC5), sendo todos os testes realizados a 20°C. Utilizou-se um sistema sensor de pratos paralelos serrados de 20mm de diâmetro, com um intervalo (*gap*) de 1 mm, para todos os testes. Após colocação das amostras deixou-se repousar durante 5 min, antes de iniciar os testes,

de forma a permitir a recuperação das amostras após compressão para atingir o *gap*. As amostras foram cobertas com parafina líquida de modo a evitar a sua desidratação.

Para todas as amostras, foram realizados testes oscilatórios de varrimento de tensões para determinar a zona de viscoelasticidade linear. A tensão variou entre 0,010000 e 2000Pa, a uma frequência constante de 1Hz.

Realizaram-se testes oscilatórios de varrimento de frequência (espectros mecânico), a uma tensão constante (contida na zona de viscoelasticidade linear), para determinar as variações dos módulos viscoelásticos G' e G'' em função da frequência (0,006283 a 628,3 rad/s). Os testes foram realizados pelo menos em triplicado.

Realizaram-se ainda curvas de escoamento para determinar a viscosidade aparente das amostras em função da velocidade de deformação. Utilizou-se um reómetro de tensão controlada (MARS III - Haake, Alemanha) (Figura 14b), com um sistema sensor de pratos paralelos serrados de 20mm de diâmetro, com um intervalo (*gap*) de 1mm. Os testes foram realizados pelo menos em triplicado.



Figura 14 - Reómetro de tensão controlada Haake RS-75 (a) e Reómetro de tensão controlada *MARS III* - Haake (b).

3.2.6 Determinação da atividade da água das bolachas

A atividade da água das bolachas foi determinada utilizando o equipamento HygroPalm HP23-AW (Rotronic) (Figura 15) a uma temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Realizaram-se medições em quadruplicado de cada bolacha ao longo de 8 semanas de armazenamento.



Figura 15 - Medidor de aw HygroPalm HP23-AW.

3.2.7 Caracterização química das bolachas

Para a determinação das características químicas das bolachas, as mesmas foram previamente trituradas, utilizando um moinho de café. Todas as medições foram realizadas pelo menos em triplicado.

3.2.7.1. Determinação do teor de humidade

A determinação do teor de humidade das bolachas foi feita utilizando um medidor de humidade PMB 202 (aeADAM) (Figura 16) a uma temperatura de 130°C . Realizaram-se medições em triplicado de todas as bolachas no dia seguinte à sua confeção.



Figura 16 - Medidor de humidade PMB 202.

3.2.7.2. Determinação do teor de cinza

O teor de cinza foi determinado por diferença de massa através da norma portuguesa NP-518 (1986). Este método envolve a inceneração de aproximadamente 3g de amostra na mufla a 550 °C até à total incineração da mesma, seguido de um arrefecimento em exsiccador por 30min. Após esse tempo, a amostra é pesada e colocada novamente na mufla (1h) até se obter peso constante. O teor de cinza presente na amostra é calculado através da equação 7.

$$\text{Cinza (\%)} = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100 \quad (7)$$

Onde m_2 é a massa do cadinho + cinza (g); m_1 é a massa do cadinho (g) e m é a massa da amostra (g).

3.2.7.3. Determinação do teor de proteína

A determinação do teor de proteína total presente nas bolachas foi feita de acordo com o método AOAC 950.36. Este baseia-se no método de Kjeldhal, segundo o qual se obtém o teor de azoto total, que é depois convertido em teor de proteína através da multiplicação por um fator de conversão (5,70). Neste método, aproximadamente 1g de amostra é digerida, destilada e titulada com uma solução de HCl 0,1N. A percentagem de proteína total existente na amostra é calculada com base na equação 8.

$$\text{Proteína Total (\%)} = \frac{(V_{\text{HCl amostra}} - V_{\text{HCl branco}}) \times N \times 1,4 \times 5,70}{m} \times 100 \quad (8)$$

Onde $V_{\text{HCl amostra}}$ é o volume de HCl gasto para titular a amostra (mL); $V_{\text{HCl branco}}$ é o volume de HCl gasto para titular o branco (mL); N é a normalidade da solução titulante de HCl; 5,70 é o fator de conversão azoto-proteína e m é a massa da amostra (g).

3.2.7.4. Determinação do teor de gordura

O teor de gordura total das bolachas foi determinado segundo o procedimento utilizado para cereais e derivados, baseado na norma portuguesa NP4168 (1991). Este procedimento baseia-se na hidrólise das ligações entre lípidos, proteínas e glúcidos através do tratamento com ácido clorídrico, etanol e ácido fórmico, seguida de filtração e extração por n-hexano num extrator de Soxhlet. Após a extração, é feita a evaporação do solvente num evaporador rotativo, secagem do balão com o resíduo em estufa durante 30min. e posterior pesagem do mesmo. O teor de matéria gorda total presente na amostra é calculado através da equação 9.

$$\text{Matéria Gorda Total (\%)} = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100 \quad (9)$$

Onde m_2 é a massa do balão + resíduo (g); m_1 é a massa do balão (g) e m é a massa da amostra (g).

3.2.7.5. Determinação do teor de Ficocianina e Aloficocianina *Spirulina*, na massa e nas bolachas com 2% e 6% de *Spirulina*

Devido ao seu elevado valor biológico e às propriedades farmacológicas que lhe estão associadas determinou-se o teor de ficocianina e aloficocianina nas bolachas com 2% e 6% de *Spirulina*. A determinação foi feita através do método desenvolvido por Boussiba & Richmond (1979) modificado por Reis et al. (1998) que se baseia na extração dos pigmentos com tampão fosfato pH 7 0,1M a baixas temperaturas e doseamento espectrofotométrico a 620 nm (Ficocianina) e a 650 nm (Aloficocianina) (Figura 17).

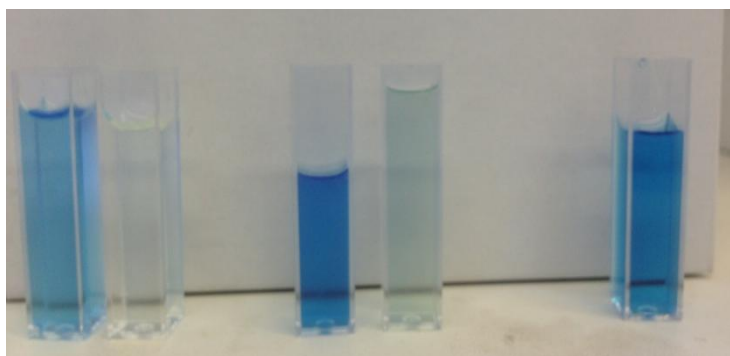


Figura 17 - Extratos de ficocianina referentes às amostras: massa 2%, bolacha 2%, massa 6%, bolacha 6% e microalga *Spirulina* (da esquerda para a direita).

O teor destes pigmentos é calculado com base nas equações 10 e 11.

$$\text{Ficocianina (\%)} = \frac{A_{620} \times V \times f}{73 \times m} \quad (10)$$

$$\text{Aloficocianina (\%)} = \frac{A_{650} \times V \times f}{58 \times m} \quad (11)$$

Onde A é a absorvância medida naquele comprimento de onda; V é o volume total de extrato (5mL); f é o fator de diluição; 73 e 58 são os coeficientes de absorção específica, $E_{1\%}^{1\text{cm}}$, com um percurso óptico de 1 cm e com a concentração de 1%, para a Ficocianina e Aloficocianina, respetivamente (Boussiba & Richmond, 1979) e m é a massa da amostra (g).

3.2.8 Análise sensorial das bolachas

A análise sensorial foi realizada apenas às bolachas com incorporação de *Chlorella* e *Spirulina*, uma vez que as restantes não estão ainda aprovadas como ingrediente alimentar. Recorreu-se a um painel de 41 provadores não treinados, 9 do sexo masculino e 32 do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 18 e os 60 anos, para a avaliação das bolachas com incorporação de 2% e 6% de *Spirulina* e de *Chlorella*, através de uma folha de prova (anexo 2) desenvolvida tendo por base a apreciação global das várias bolachas. As bolachas foram codificadas da seguinte forma: bolacha com 2% de *Chlorella* - AL, bolacha com 6% de *Chlorella* - MA, bolacha com 2% de *Spirulina* - PL e bolacha com 6% de *Spirulina* - AR (Figura 18) e as provas de análise sensorial foram realizadas numa sala estandardizada de acordo com a NP 4258 (1993).

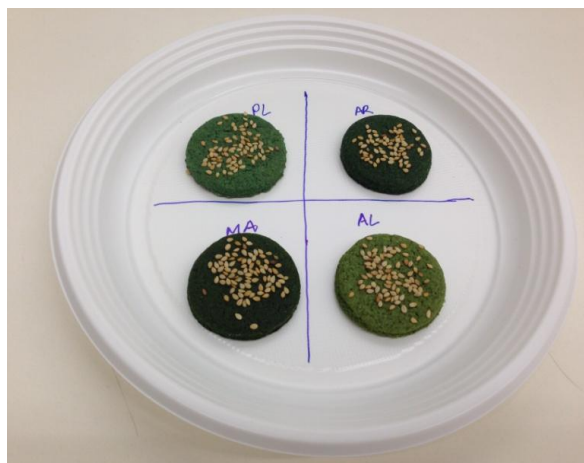


Figura 18 - Exemplo de forma de apresentação das amostra para análise sensorial. A ordem de apresentação das amostras (AL, MA, PL e AR) foi variada e aleatória.

3.2.9 Análise estatística

O tratamento estatístico dos dados experimentais foi feito recorrendo ao Software STATISTICA da StatSoft (versão 8.0). Realizou-se uma análise de variância (ANOVA), para comparar e avaliar a existência de diferenças significativas para os diferentes parâmetros analisados. Utilizou-se o teste de comparação de médias de Scheffé – *Post Hoc Comparison* para um nível de significância estatística de 95% ($p < 0,05$).

Ao longo da tese todos os resultados são apresentados em termos de média \pm desvio padrão.

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

4.1. Caracterização das matérias-primas

4.1.1 Avaliação da composição química da farinha de trigo e das microalgas

A composição química da farinha de trigo e das microalgas utilizada na formulação das bolachas encontra-se, em termos percentuais, na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição química da farinha de trigo e das microalgas utilizadas na formulação das bolachas (% m/m).

	Proteína (%)	Hidratos de carbono (%)	Lípidos (%)	Cinza (%)
<i>Spirulina platensis</i> F&M-C256*	63,9 ± 1,0	12,8 ± 0,2	10,7 ± 0,6	6,1 ± 0,1
<i>Chlorella vulgaris</i> Allma*	56,8 ± 2,7	5,9 ± 0,3	16,9 ± 2,8	9,3 ± 1,5
<i>Tetraselmis suecica</i> F&M-M33*	40,2 ± 0,5	10,2 ± 0,2	28,5 ± 1,2	15,7 ± 0,2
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> F&M-M40*	38,8 ± 0,1	11,0 ± 0,7	19,3 ± 1,7	14,8 ± 0,1
Farinha de trigo**	9	72	1,3	-

* Dados fornecidos pelos colegas da Universidade de Florença.

** Dados fornecidos no rótulo da embalagem.

Através dos dados apresentados para a composição química da farinha de trigo e das microalgas verifica-se que a farinha é constituída maioritariamente por hidratos de carbono (72%) e apresenta uma baixa quantidade de gordura (1,3%). Relativamente às microalgas, em todos os casos a proteína é o componente maioritário e de uma forma geral são bastante ricas em gordura e apresentam baixa percentagem de hidratos de carbono. Das microalgas utilizadas, a *Spirulina platensis* é a que apresenta maior teor proteico (63,9%) e maior percentagem de hidratos de carbono (12,8%). A *Tetraselmis suecica* é a microalga com maior fração lipídica (28,5%) e maior percentagem de matéria inorgânica (15,7%).

Efetivamente, verifica-se que, enquanto a *Spirulina* e a *Chlorella* apresentam teores muito elevados de proteína (57-64%) e relativamente baixo teor lipídico (11-17%), as microalgas marinhas *Tetraselmis* e *Phaeodactylum*, apresentam menor teor proteico (39-40%) e elevado teor lipídico (19-29%). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Batista et al. (2013), em que a *Spirulina* e a *Chlorella* apresentaram elevado teor proteico (38-45%) e baixo teor lipídico (4-5%), enquanto as microalgas

marinhas *Isochrysis galbana* e *Diacronema vlkianum* apresentaram elevado teor lipídico (18-24%) e 38-40% de proteína.

4.1.2 Avaliação do índice de absorção de água e óleo da farinha e das microalgas

Os estudos de absorção de água e óleo da farinha e das microalgas foram realizados de acordo com o descrito no capítulo 3.2.1. Nas Figuras 19 e 20 estão representados os resultados obtidos para a capacidade de absorção de água e de óleo, respetivamente, da farinha, das microalgas e da mistura farinha + microalgas (proporção 5:1).

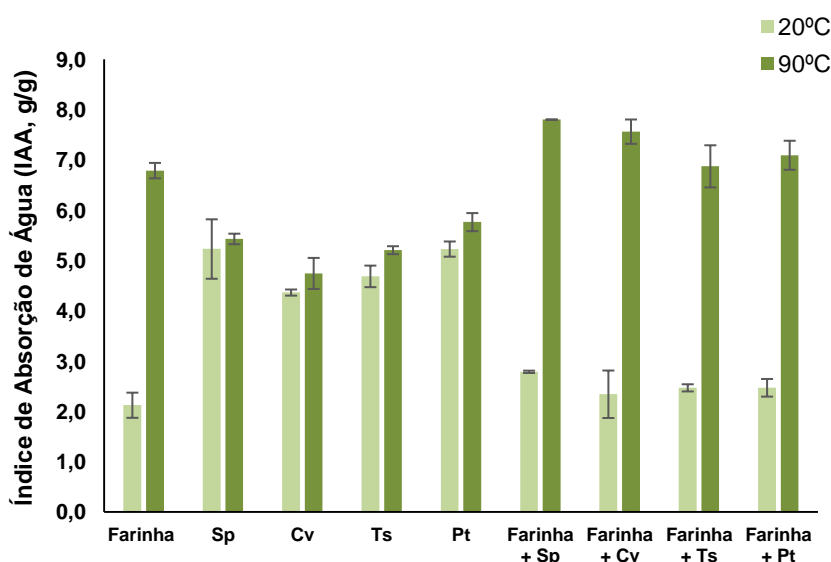


Figura 19 - Índice de absorção de água para a farinha, microalgas e farinha + microalgas a 20°C e 90°C.

De acordo com a Figura 19 verifica-se que, a 20°C, as microalgas apresentam um índice de absorção de água significativamente mais elevado ($p < 0,05$) quando comparadas com a farinha de trigo (as microalgas apresentam valores na ordem dos 5,0 e a farinha 2,1). Verifica-se também que não existem diferenças significativas entre a absorção de água das diferentes microalgas, embora esta seja maior para a *Phaeodactylum* e para a *Spirulina* ($p = 0,068$). Estes resultados parecem estar relacionados com a composição da parede celular das microalgas, uma vez que a *Spirulina* não apresenta parede celular rígida e a *Phaeodactylum* apresenta uma parede constituída por sílica, absorvendo desta forma mais água que as algas verdes (parede celulósica). A 90°C, verifica-se um aumento significativo ($p = 0,00001$) do índice de absorção de água da farinha de trigo (em relação aos 20°C), resultado explicado pela ocorrência de gelatinização do amido. A *Spirulina* e a *Chlorella* não apresentam

diferenças significativas ($p>0,05$) na absorção de água quando se aumenta a temperatura do ensaio. Já a *Tetraselmis* e a *Phaeodactylum* apresentam uma absorção de água significativamente maior ($p=0,017$) quando se aumenta a temperatura, embora em muito menor grau do que na farinha de trigo. Estes dados sugerem que o aumento da temperatura não é suficiente para promover a hidratação e gelatinização do amido e outros polissacáridos presentes no interior das células das microalgas, estando a absorção de água mais relacionada com a composição da parede celular.

Relativamente às misturas de farinha e microalgas, a 20°C não se verificam diferenças significativas na absorção de água em relação à farinha, enquanto a 90°C há um aumento significativo ($p<0,05$).

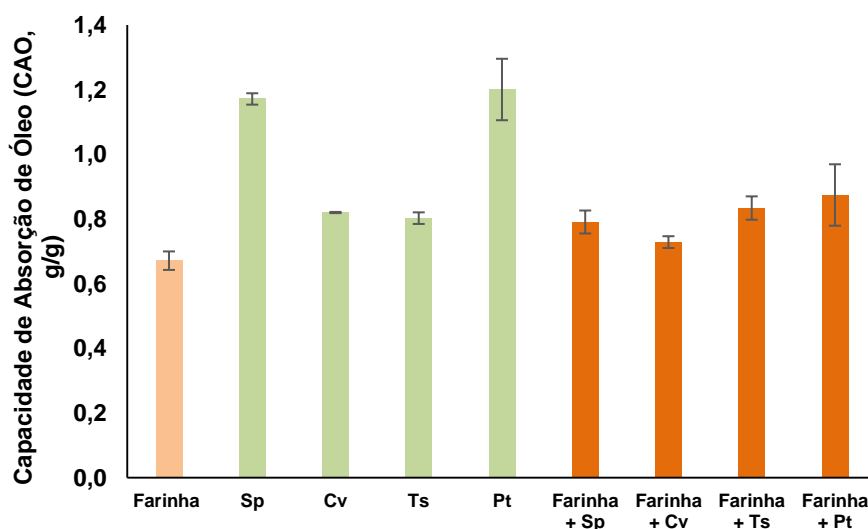


Figura 20 - Capacidade de absorção de óleo para a farinha, microalgas e farinha + microalgas a 20°C.

Através da análise da Figura 20 é possível verificar que a *Spirulina* e *Phaeodactylum* apresentam diferenças significativas ($p<0,05$) em relação às restantes microalgas e à farinha, apresentado um valor mais elevado de absorção de óleo (1,20 para a *Phaeodactylum* e 1,17 para a *Spirulina*). Verifica-se ainda que quando se mistura farinha e microalgas, a *Tetraselmis*, a *Phaeodactylum* e a *Spirulina* apresentam uma absorção de óleo significativamente ($p<0,05$) mais alta que a farinha isolada.

De um modo geral, estes dados sugerem que ao incorporar microalgas na formulação base das bolachas, teremos valores de absorção de água e óleo mais

elevados. Este facto, por um lado, é vantajoso, pois significa que será necessária maior quantidade de água para hidratação da massa, logo poderá ser requerida menor quantidade de farinha.

4.2. Análise da massa e das bolachas

4.2.1 Aspeto geral das bolachas

As bolachas com incorporação de microalgas são bastante atrativas visualmente, apresentando uma cor verde cuja tonalidade varia, dependendo da microalga utilizada, do verde-azulado (*Spirulina*) ao verde acastanhado (*Phaeodactylum*). Estas apresentam uma espessura média de 7,5 mm, sendo a bolacha controlo um pouco mais espessa (8,3 mm) e um diâmetro médio de 47,1 mm. Na Figura 21 encontram-se fotos da bolacha controlo e das bolachas com 2% e 6% das diferentes microalgas.

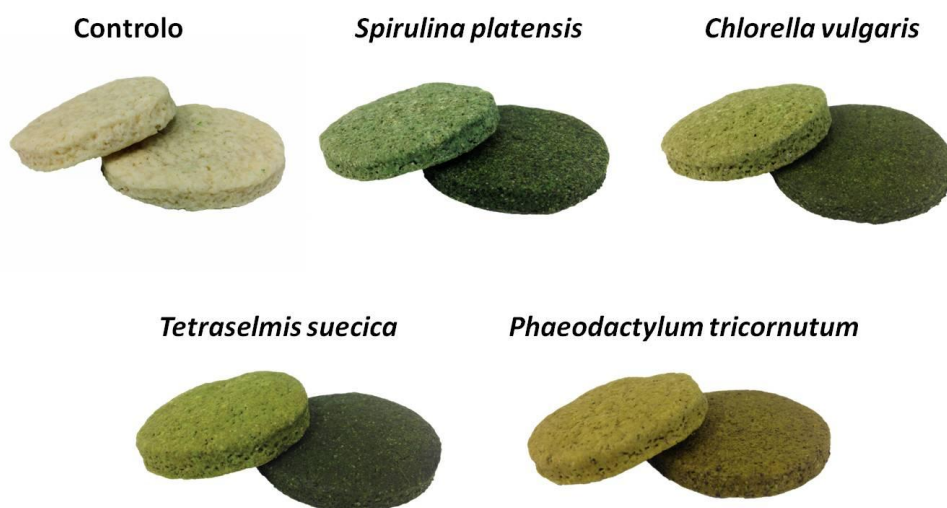


Figura 21 - Bolachas desenvolvidas - controlo e com 2% e 6% das diferentes microalgas.

4.2.2 Avaliação da cor das massas e das bolachas

A avaliação da cor das massas e das bolachas foi feita de acordo com o descrito no capítulo 3.2.3.

Os resultados obtidos para os parâmetros L^* , a^* , b^* , C^* e h^* para as bolachas com incorporação de 2% e 6% das diferentes microalgas e para a bolacha controle, na semana 0, encontram-se na Figura 22.

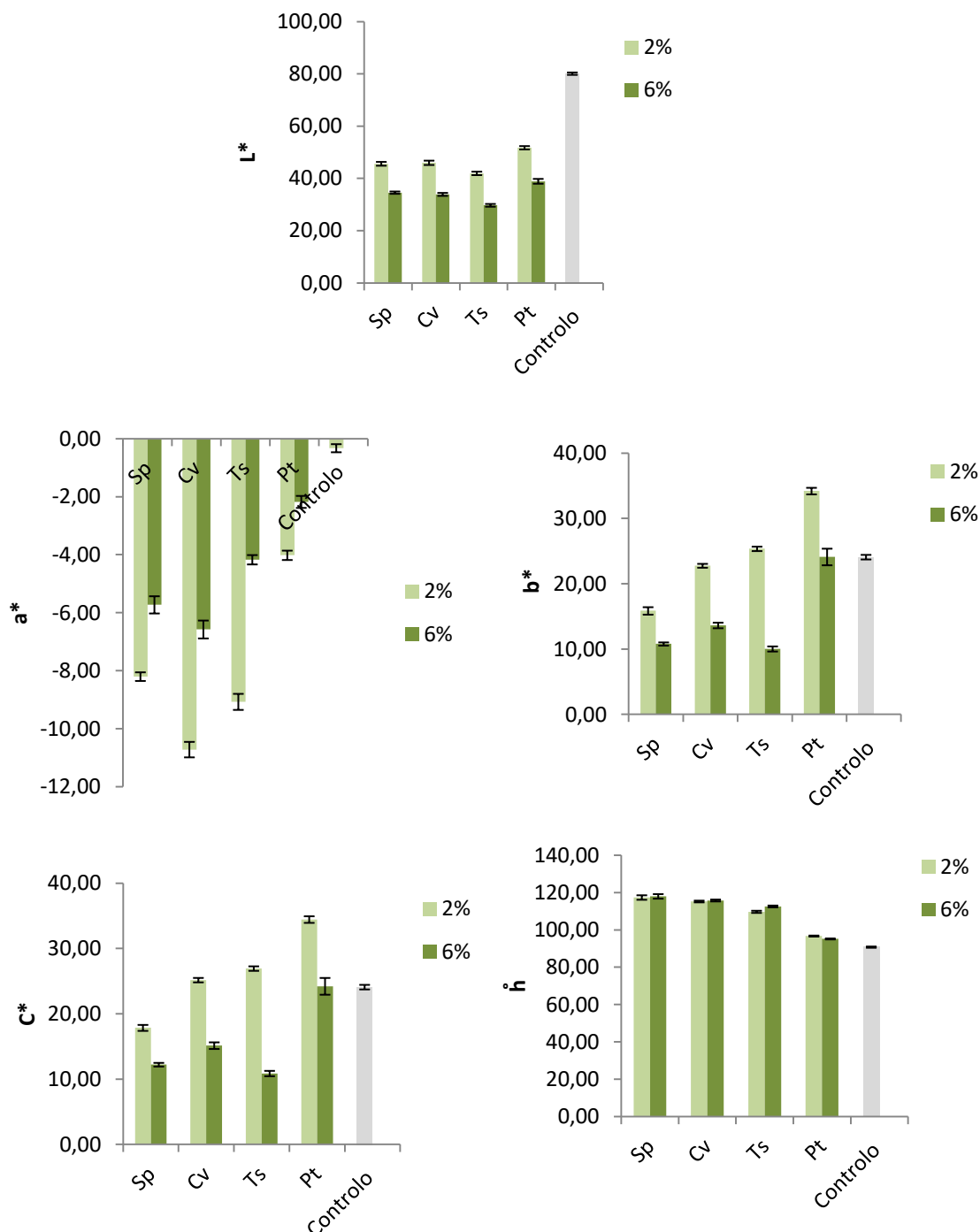


Figura 22 - Comparação dos parâmetros L^* , a^* , b^* , C^* e h^* das bolachas com 2% e 6% (Sp - *Spirulina*; Cv - *Chlorella*; Ts - *Tetraselmis*; Pt - *Phaeodactylum*) de microalga e da bolacha controle na semana 0.

Analisando o parâmetro L^* , verifica-se uma diminuição da luminosidade com o aumento da concentração de microalga, significando que a adição de biomassa

microalgal resulta na obtenção de bolachas mais escuras. Verifica-se também que com o aumento da concentração de microalga, de 2% para 6% há uma diminuição dos parâmetros cromáticos a^* , b^* (as bolachas com 2% são mais verdes e mais amarelas do que com 6%) e C^* , indicando colorações menos intensas. Por outro lado, o parâmetro h° apresenta um valor entre os 100° e os 120° (tonalidade entre o amarelo e o verde) independentemente da concentração utilizada. Estes resultados podem parecer inesperados, considerando que na Figura 21 as bolachas com 6% parecem ter colorações verdes mais intensas. Aparentemente, o escurecimento, aliado à manutenção da tonalidade (h°) “mascaram” a redução da intensidade da cor. Em estudos anteriores, verificou-se um efeito semelhante para bolachas com *Chlorella* (Gouveia et al., 2007) e com *Isochrysis galbana* (Gouveia et al., 2008), em que se verifica uma redução nos parâmetros a^* e b^* com o aumento da concentração de microalga de 0,5% a 3%. Este efeito poderá estar relacionado com uma maior degradação de pigmentos durante a cozedura ou com um efeito de saturação da cor.

Verifica-se ainda que as bolachas com 2% de *Chlorella* e *Tetraselmis* apresentam os valores mais elevados de a^* (em módulo) e valores intermédios de b^* (22,77 e 25,36). Estes resultados estão de acordo com o alto teor de clorofila que caracteriza as algas da família das clorófitas (Plaza et al., 2009). As bolachas com *Spirulina* apresentam uma tonalidade semelhante ($h^\circ = 117,33$), embora a intensidade de cor seja muito menos intensa do que nas clorófitas (menores valores de a^* , b^* e C^*), refletindo o menor teor de clorofilas e carotenoides geralmente presente nesta alga (Batista et al., 2013). Por outro lado, as bolachas com *Phaeodactylum* apresentam baixos valores de a^* (em módulo) e os maiores valores de b^* , resultando um *hue angle* de 100° , mais próximo do amarelo (90°) do que do verde (180°). Estes resultados deverão estar relacionados com a presença de fucoxantina, carotenoide de coloração acastanhada usualmente presente em concentrações elevadas nesta diatomácea (Kim et al., 2012).

Na Tabela 3 encontram-se os resultados obtidos para as diferenças de cor verificadas entre as bolachas com incorporação de 2% e 6% de microalga na semana 0.

Tabela 3 - Variação de cor entre as bolachas com 2% e 6% (Sp - *Spirulina*; Cv - *Chlorella*; Ts - *Tetraselmis*; Pt - *Phaeodactylum*) de microalga analisada na semana 0.

	ΔE^*
Sp	12,40
Cv	15,70
Ts	20,20
Pt	16,42

É possível verificar que todos os valores de ΔE^* são superiores a 5, significando que a diferença de cor entre as bolachas com 2% e as bolachas com 6% é visível a olho nu (Castellar et al., 2006). As bolachas cuja diferença é maior são as bolachas com incorporação de *Phaeodactylum* e *Tetraselmis*.

Na Figura 23 encontra-se a localização no espaço bidimensional, da cor da massa e da bolacha com 2% e 6% de microalga na semana 0.

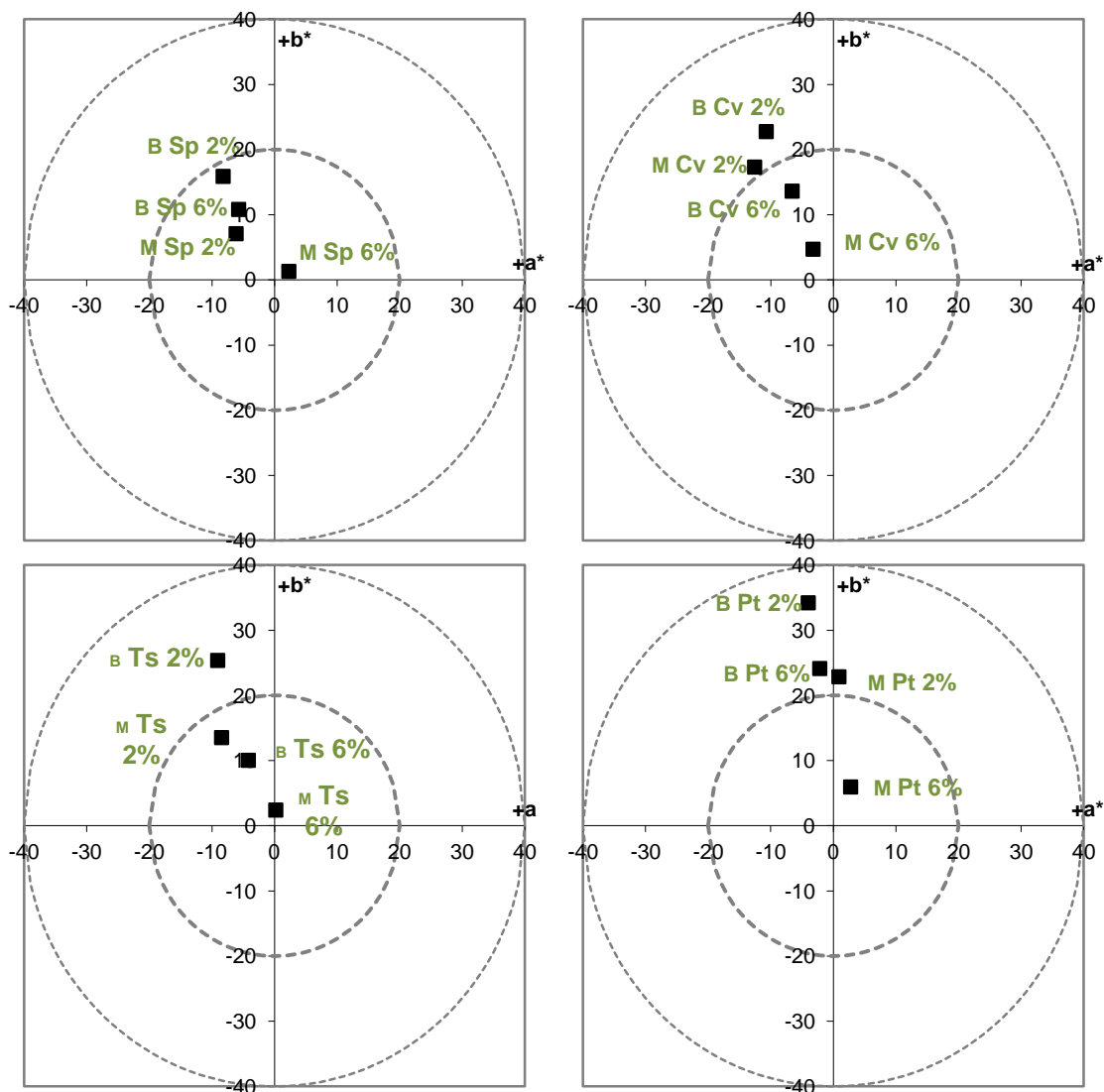


Figura 23 - Localização no espaço bidimensional da cor da massa (M) e da bolacha (B) com 2% e 6% de microalga (Sp - *Spirulina*; Cv - *Chlorella*; Ts - *Tetraselmis*; Pt - *Phaeodactylum*) na semana 0.

Através da análise da Figura 23 verifica-se que o valor de a^* das massas é menos negativo do que o das bolachas, para a mesma concentração de alga, excepto quando se utiliza 2% de *Chlorella* e quando se incorpora *Phaeodactylum* (2% e 6%). Relativamente ao valor de b^* , as bolachas apresentam valores mais elevados do que as massas, usando a mesma concentração, significando que as bolachas apresentam

tonalidade mais amarela do que a massa. Comparando os resultados obtidos com a Figura 7 apresentada na revisão bibliográfica (secção 2.3.2.1), verifica-se que as massas e bolachas com incorporação de *Spirulina* apresentam valores de a^* e b^* dentro do círculo dos 20 (zona verde azulada). As bolachas com *Phaeodactylum* apresentam valores de a^* e b^* dentro do círculo dos 40 (zona verde amarelada) excepto a massa com 6% . Os valores de a^* e b^* para a massa e bolacha com 2% de *Chlorella* encontram-se dentro do círculo dos 40 (zona verde mais intensa) enquanto os valores da massa e bolacha com 6% de *Chlorella* encontram-se dentro do círculo dos 20 (zona verde menos intensa). O mesmo se verifica para a massa e bolacha com *Tetraselmis*.

Na Figura 24 encontra-se a comparação do parâmetro L^* e h° da massa e da bolacha controlo e com incorporação de 2% e 6% de microalga.

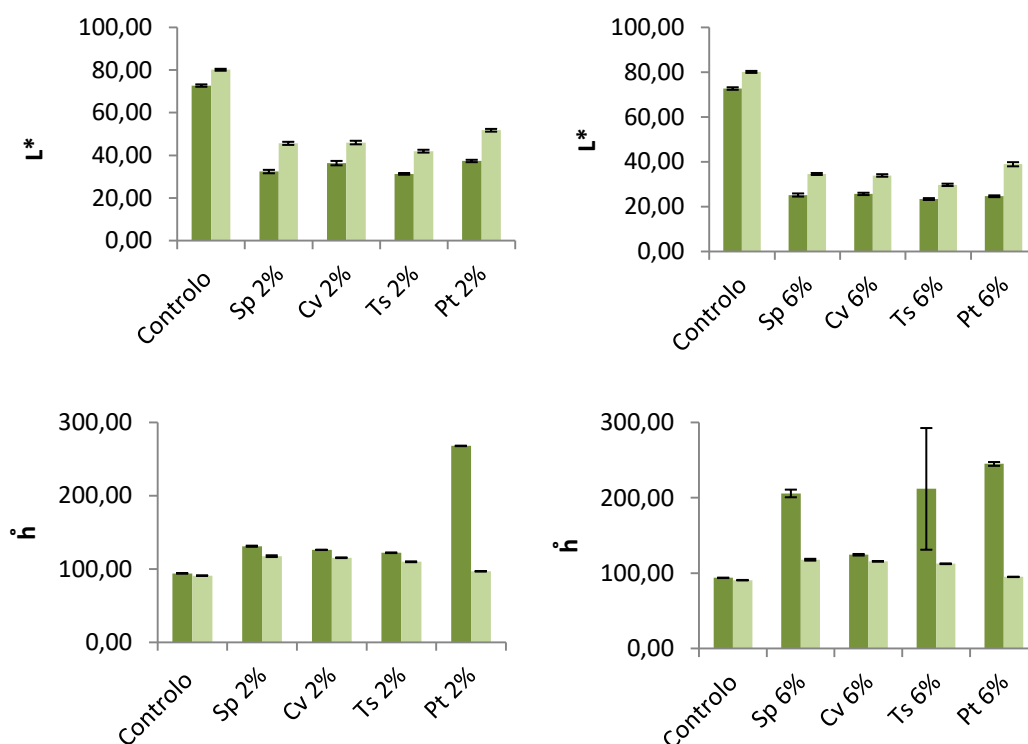


Figura 24 - Comparação dos parâmetros L^* e h° da massa (verde escuro) e das bolachas (verde claro) controlo e com incorporação de 2% e 6% (Sp - *Spirulina*; Cv - *Chlorella*; Ts - *Tetraselmis*; Pt - *Phaeodactylum*) das diferentes microalgas na semana 0.

Através da análise da Figura 24 verifica-se que, o valor de L^* é mais elevado para as bolachas, independentemente da microalga utilizada, significando que a massa apresenta uma cor mais escura do que as bolachas. Verifica-se também que para as bolachas com *Phaeodactylum* (2% e 6%), *Spirulina* (6%) e *Tetraselmis* (6%) há uma diminuição do valor de h° das bolachas em relação às massas, passando as

tonalidades de mais verdes para mais amarelas (especialmente quando se utiliza a *Phaeodactylum*) o que pode indicar uma perda de pigmentos durante a cozedura.

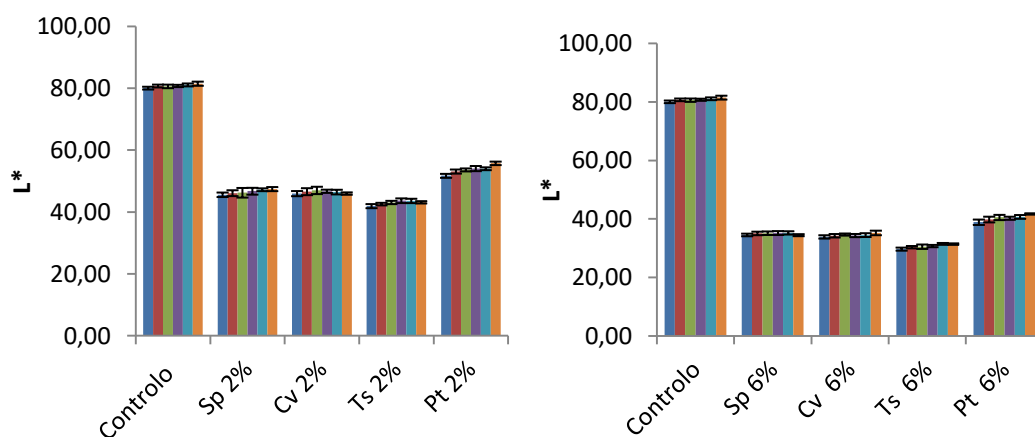
Na Tabela 4 encontram-se os resultados obtidos para a variação de cor entre as massas e as bolachas controlo e com 2% e 6% de microalga na semana 0.

Tabela 4 - Variação de cor entre as massas e as bolachas controlo e com 2% e 6% (Sp - *Spirulina*; Cv - *Chlorella*; Ts - *Tetraselmis*; Pt - *Phaeodactylum*) de microalga analisada semana 0.

	Controlo	Sp 2%	Cv 2%	Ts 2%	Pt 2%	Sp 6%	Cv 6%	Ts 6%	Pt 6%
ΔE^*	7,63	16,01	11,22	15,93	18,97	15,58	12,58	10,85	23,63

Através da análise da Tabela 4 é possível verificar que todos os valores de ΔE^* são superiores a 5, significando que a diferença de cor entre a massa e as bolachas é bastante visível a olho nu (Castellar et al., 2006). A microalga cuja diferença é maior é a *Phaeodactylum*.

Na Figura 25 estão representados os resultados dos parâmetros L^* , a^* e b^* obtidos para a bolacha controlo e para as bolachas com incorporação de 2% e 6% de microalga ao longo do tempo.



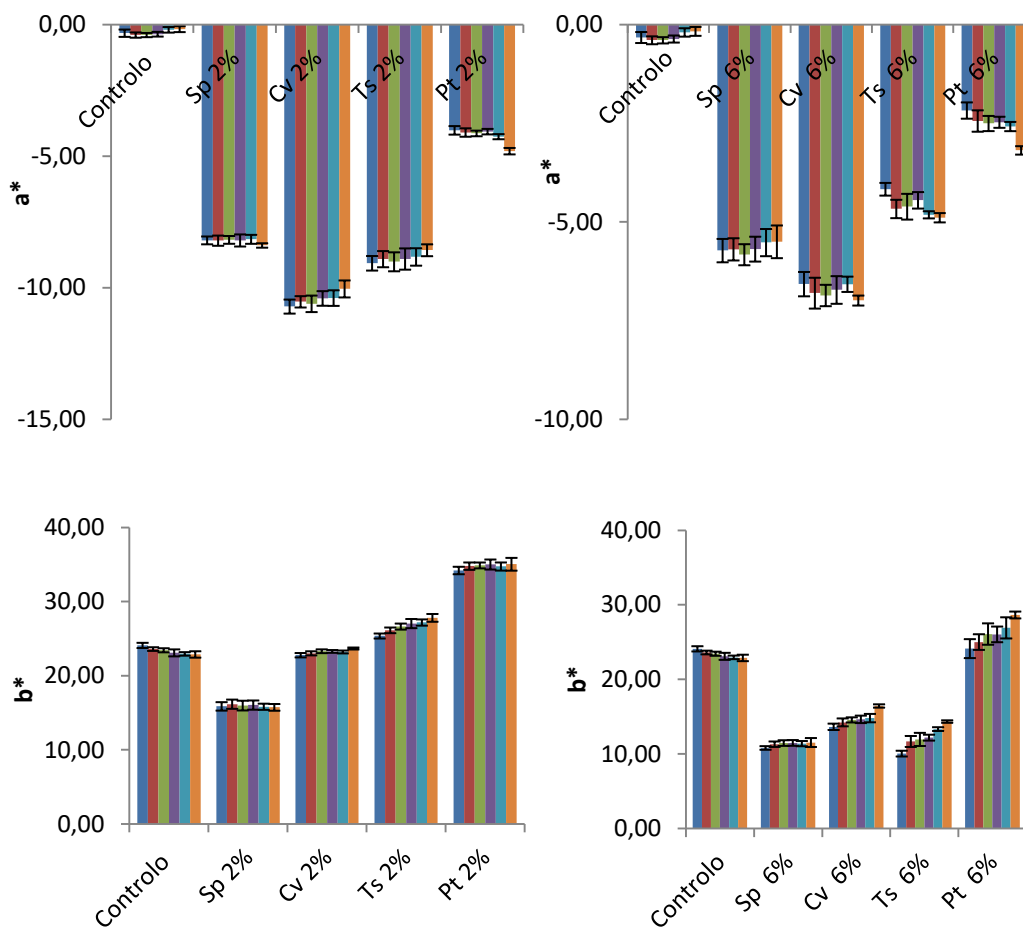
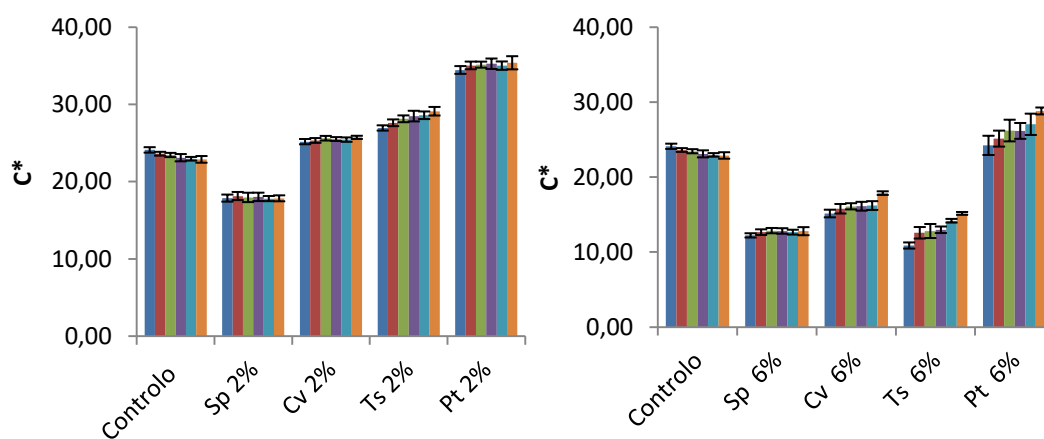


Figura 25 - Parâmetros L^* , a^* e b^* obtidos para a bolacha controle e para as bolachas com incorporação de 2% e 6% (*Sp* - *Spirulina*; *Cv* - *Chlorella*; *Ts* - *Tetraselmis*; *Pt* - *Phaeodactylum*) de microalga ao longo do tempo (azul escuro - semana 0; vermelho - semana 1; verde - semana 2; roxo - semana 3; azul claro - semana 4; laranja - semana 8).

Na Figura 26 estão representados os resultados dos parâmetros C^* e h° obtidos para a bolacha controle e para as bolachas com incorporação de 2% e 6% de microalga ao longo do tempo.



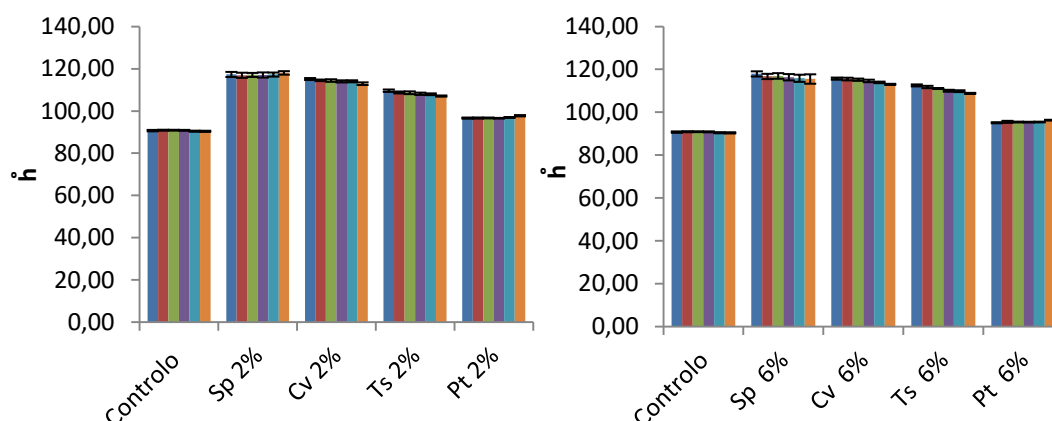


Figura 26 - Parâmetros C^* e h° obtidos para a bolacha controle e para as bolachas com incorporação de 2% e 6% (Sp - *Spirulina*; Cv - *Chlorella*; Ts - *Tetraselmis*; Pt - *Phaeodactylum*) de microalga ao longo do tempo (azul escuro - semana 0; vermelho - semana 1; verde - semana 2; roxo - semana 3; azul claro - semana 4; laranja - semana 8).

Através da análise das Figuras 25 e 26 verifica-se que independentemente da concentração e da microalga utilizada, os parâmetros de cor avaliados mantêm-se bastante estáveis ao longo do tempo.

Nas Tabelas 5 e 6 encontram-se os resultados obtidos para a variação de cor analisada nas bolachas com incorporação de 2% e 6% de microalga ao longo do tempo.

Tabela 5 - Variação de cor analisada na bolacha controle e nas bolachas com 2% de microalga (Sp - *Spirulina*; Cv - *Chlorella*; Ts - *Tetraselmis*; Pt - *Phaeodactylum*) ao longo do tempo (em relação à cor da semana 0).

ΔE^*					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 8
Controle	0,84	0,86	1,23	1,55	1,89
Sp 2%	0,60	0,66	1,16	1,63	1,86
Cv 2%	0,70	1,17	0,96	0,74	1,12
Ts 2%	1,02	1,73	2,43	2,49	2,78
Pt 2%	1,50	2,03	2,48	2,37	4,19

Tabela 6 - Variação de cor analisada na bolacha controle e nas bolachas com 6% de microalga (Sp - *Spirulina*; Cv - *Chlorella*; Ts - *Tetraselmis*; Pt - *Phaeodactylum*) ao longo do tempo (em relação à cor da semana 0).

ΔE^*					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 8
Controle	0,84	0,86	1,23	1,55	1,89
Sp 6%	0,73	0,89	0,94	0,94	0,77
Cv 6%	0,75	1,26	1,11	1,32	3,13
Ts 6%	1,83	2,12	2,40	3,80	4,69
Pt 6%	1,31	2,57	2,37	3,35	5,42

Através da análise das Tabelas 5 e 6, verifica-se que as variações de cor (ΔE^*) ao longo do tempo verificadas nas bolachas com incorporação de 2% e 6% de microalga são inferiores a 5 (excepto para o *Phaeodactylum* 6% - 5,42), o que significa que estas diferenças não são detetáveis a olho nu (Castellar et al., 2006). Estes resultados bem como os anteriores indicam uma boa estabilidade da cor do produto ao longo do tempo.

4.2.3 Avaliação da textura das bolachas

A textura das bolachas foi determinada de acordo com os métodos descritos no capítulo 3.2.4. Dos texturogramas obtidos retirou-se a Firmeza (N), definida como força máxima realizada pela penetração da sonda, e o Trabalho (N*s), calculado pela área abaixo da curva força *versus* tempo de cada texturograma. Nas Figuras 27 e 28 encontram-se os resultados obtidos para o Trabalho (N*s) e para a Firmeza (N) medidos na semana 0 na bolacha controlo bem como nas bolachas com 2% e 6% de microalga.

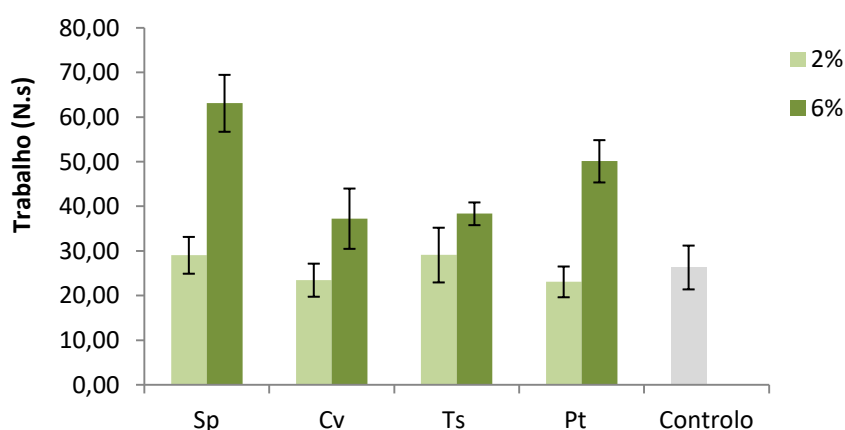


Figura 27 - Comparação do trabalho realizado pela sonda na bolacha controlo e nas bolachas com incorporação de 2% e 6% das diferentes microalgas (Sp - *Spirulina*; Cv - *Chlorella*; Ts - *Tetraselmis*; Pt - *Phaeodactylum*) na semana 0.

Analisando os dados referentes ao trabalho realizado pela sonda verifica-se que, independentemente da microalga utilizada, as bolachas com 2% de incorporação não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$) quando comparadas com a bolacha controlo, significando que a incorporação de 2% não é suficiente para produzir alterações no trabalho de penetração realizado pela sonda. Comparando as bolachas com 2% de microalga entre si, não se verificam diferenças significativas ($p < 0,05$), exceto entre a *Spirulina* e a *Chlorella*.

Aumentando a concentração de alga para 6% já se verificam diferenças significativas ($p < 0,05$), resultando bolachas com valores mais altos de trabalho de penetração. De facto, enquanto a bolacha controlo e a bolacha com 2% de alga apresentam valores de trabalho entre os 24-29 N.s, as bolachas com 6% de *Chlorella* e *Tetraselmis* apresentam valores 37-38 N.s, as bolachas com 6% de *Phaeodactylum* 50 N.s e as bolachas com 6% de *Spirulina* 63 N.s. Comparando as bolachas com 6% de microalga entre si, verifica-se que os valores de trabalho são significativamente diferentes ($p < 0,05$) exceto entre a *Chlorella* e a *Tetraselmis* (família das Clorófitas).

Estes resultados estão de acordo com os valores de absorção de água e óleo apresentados na secção 4.1.2 com valores mais elevados para a *Spirulina*, seguida da *Phaeodactylum* e por fim as microalgas clorófitas. Depreende-se que quando se adicionam microalgas que absorvem mais água e óleo a estrutura das bolachas fica mais forte, oferecendo maior resistência à penetração da sonda. Estes dados sugerem que será possível aumentar o teor de água e reduzir o teor de farinha, resultando bolachas com as mesmas características de textura que a bolacha controlo.

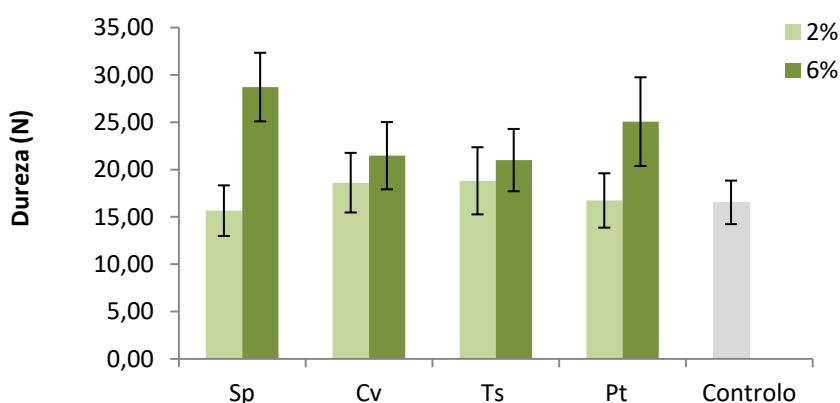


Figura 28 - Comparação da firmeza das bolachas com incorporação de 2% e 6% das diferentes microalgas (Sp - *Spirulina*; Cv - *Chlorella*; Ts - *Tetraselmis*; Pt - *Phaeodactylum*) na semana 0.

Relativamente aos resultados de firmeza, apresentados na Figura 28, verifica-se um comportamento concordante com os valores do trabalho (Figura 27). No entanto, considerando o cálculo da firmeza a partir da força máxima, este apresentou erros maiores do que o cálculo da área e consequentemente a discriminação das amostras é menos evidente. De facto, este material (bolachas) é muito quebradiço e heterogéneo tornando difícil a repetibilidade das determinações, mesmo com mais de 10 medições por amostra. A bolacha com incorporação de 6% de *Spirulina* é a que apresenta maior firmeza (29 N), seguindo-se da bolacha com 6% de *Phaeodactylum* (24 N). A firmeza das bolachas com incorporação de 2% de microalga não apresenta

diferenças significativas ($p>0,05$) quando comparadas entre si (16-19 N) e quando comparadas com a bolacha controlo (17 N). A firmeza das bolachas com *Chlorella* e com *Tetraselmis* não apresenta diferenças significativas ($p<0,05$), independentemente da concentração de microalga utilizada. Tal como verificado no caso do trabalho, a firmeza da bolacha também aumenta com o aumento da concentração utilizada.

Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores em que se também se verificou um aumento linear da firmeza de bolachas com o aumento da concentração de *Chlorella* de (Gouveia et al., 2007) e de *Isochrysis* (Gouveia et al., 2008) de 0,5% a 3%. O mesmo efeito “texturizante” ou “estruturante” das microalgas foi descrito noutro tipo de produtos alimentares, como é o caso de massas alimentícias com *Spirulina* e *Chlorella* (Fradique et al., 2010).

Uma vez que o parâmetro trabalho realizado pela sonda permite discriminar melhor as diferenças entre as amostras, optou-se por só apresentar os resultados obtidos ao longo do tempo para este parâmetro. Nas Figuras 29 e 30 encontram-se os resultados obtidos para a variação do trabalho realizado pela sonda ao longo do tempo, para a bolacha controlo e para as bolachas com incorporação de 2% e 6% de microalga, respetivamente.

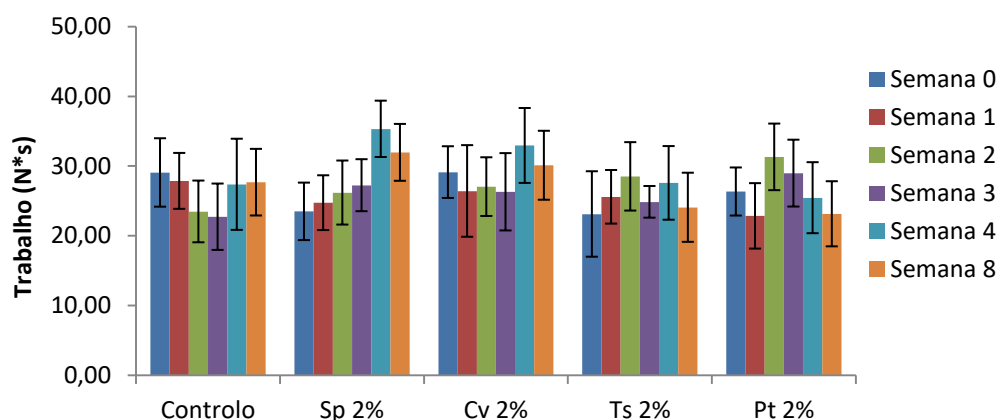


Figura 29 - Variação do Trabalho realizado pela na bolacha controlo e nas bolachas com 2% de microalga (Sp - *Spirulina*; Cv - *Chlorella*; Ts - *Tetraselmis*; Pt - *Phaeodactylum*) ao longo do tempo.

Através da análise da Figura 29 é possível verificar que a bolacha controlo, a bolacha com 2% de *Chlorella*, a bolacha com 2% de *Tetraselmis* e a bolacha com 2% de *Phaeodactylum* não apresentam diferenças significativas ($p>0,05$) ao longo do tempo, significando que estas se mantêm bastante estáveis ao longo do

armazenamento. Em relação à bolacha com 2% de *Spirulina*, esta mantém-se estável ao longo do primeiro mês e aumenta significativamente ($p<0,05$) após esse período.

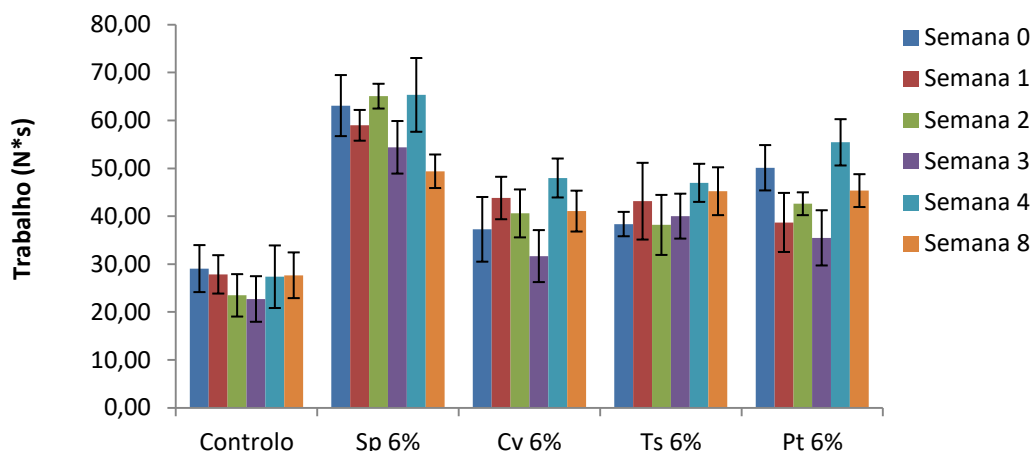


Figura 30 - Variação do Trabalho realizado pela na bolacha controlo e nas bolachas com 6% de microalga (Sp - *Spirulina*; Cv - *Chlorella*; Ts - *Tetraselmis*; Pt - *Phaeodactylum*) ao longo do tempo.

Através da análise da Figura 30 verifica-se que a bolacha com 6% de *Spirulina* apresenta um comportamento semelhante, no primeiro mês, à bolacha com 2% de *Spirulina* mas depois diminui bastante na oitava semana. A bolacha com 6% de *Chlorella* e a bolacha com 6% de *Phaeodactylum* apresentam algumas variações ao longo do tempo mas a semana zero e a semana oito não apresentam diferenças significativas ($p>0,05$). A bolacha com 6% de *Tetraselmis* apresenta algumas diferenças entre a semana dois e a semana 4, mantendo-se estável nas restantes. De um modo geral, as bolachas com 6% de microalgas parecem ter um comportamento de textura menos estável, mas provavelmente isso poderá estar associado com o facto de estas bolachas serem mais duras e friáveis, sendo os resultados de textura mais variáveis.

4.2.4 Avaliação do comportamento reológico das massas

O efeito da incorporação de *Spirulina* no comportamento reológico das massas das bolachas foi estudado de acordo com o descrito no capítulo 3.2.5. Optou-se por só foi realizar a avaliação do comportamento reológico das massas das bolachas com incorporação de *Spirulina* uma vez que estas foram as que demonstraram maior impacto em termos estruturais. Os testes de varrimento de tensão, realizados para definir a zona de viscoelasticidade linear, encontram-se no anexo 3. Os espectros mecânicos das massas com as formulações F1 (controlo), F2 (2% de microalga) e F3 (6% de microalga) encontram-se na Figura 31.

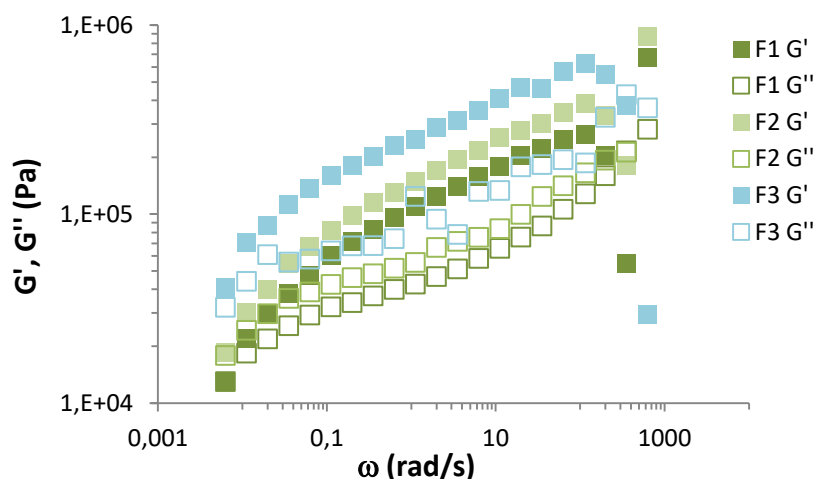


Figura 31 - Espectros mecânicos das massas das formulações F1 (controle), F2 (2% alga) e F3 (6% alga) utilizando *Spirulina*.

Analisando os espectros mecânicos apresentados na Figura 31, verifica-se que a componente elástica (G') é superior à componente viscosa (G'') para todas as massas analisadas, revelando um comportamento predominantemente elástico. Verifica-se também que a formulação F3 (massa da bolacha com incorporação de 6% de *Spirulina*) é a mais estruturada uma vez que apresenta valores de G' superiores às outras formulações, indicando desta forma que a incorporação desta microalga na massa apresenta implicações estruturais, resultado já comprovado na análise da textura das bolachas com *Spirulina*. Em todas as formulações verifica-se que a diferença entre os valores de G' e G'' é inferior a uma década e que existe uma grande dependência da frequência.

Tendo em conta a capacidade estruturante da *Spirulina* nas massas e nas bolachas decidiu-se avaliar a possibilidade de reduzir o teor de farinha (Tabela 1). Na Figura 32 encontram-se os espectros mecânicos das massas com as formulações F1 (49% farinha), F3 (43% farinha + 6% de *Spirulina*), F4 (40% farinha + 6% de *Spirulina*) e F5 (37% farinha e 6% de *Spirulina*).

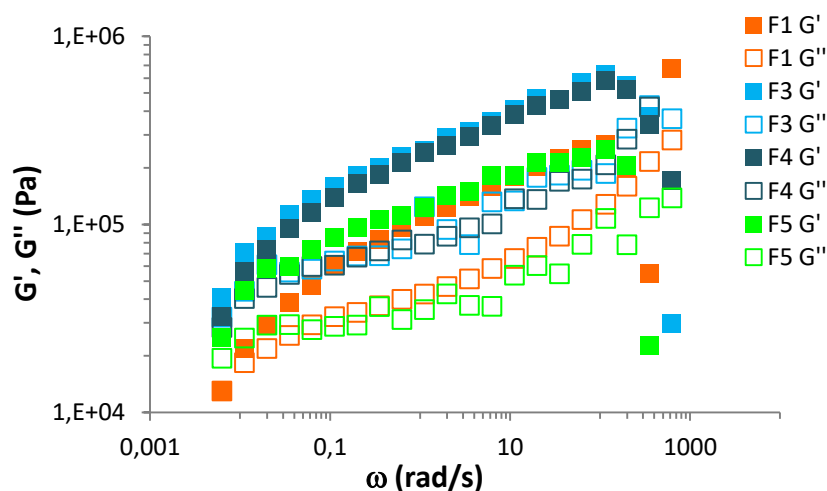


Figura 32 - Espetros mecânicos das formulações controle (F1) e com 6% de *Spirulina* e diferentes concentrações de farinha: F3 (43% farinha), F4 (40% farinha) e F5 (37% farinha).

Através da análise dos espectros mecânicos apresentados na Figura 32, verifica-se que o módulo elástico (G') é superior ao módulo viscoso (G'') para todas as formulações analisadas, indicando um comportamento predominantemente elástico. Também é possível verificar que as massas que têm na sua composição 43% e 40% de farinha de trigo apresentam um comportamento muito semelhante e são massas mais estruturadas do que a massa feita com 37% de farinha de trigo, resultado esperado uma vez que com esta formulação não foi possível laminar e cortar bolachas (massa muito adesiva). Verifica-se Também nestes espectros, é possível verificar uma diferença entre os valores de G' e G'' inferior a uma década e uma dependência acentuada da frequência.

Comparando os valores médios de G' à frequência de 1 Hz para as diferentes amostras verifica-se que, para massas com 6% de *Spirulina*, é possível reduzir o teor de farinha de 49% para 37%, mantendo os valores dos módulos viscoelásticos semelhantes ao da massa controle (Figura 33).

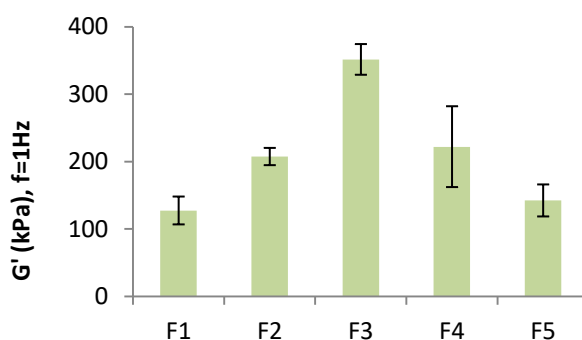


Figura 33 - Valores de G' a 1 Hz para as formulações F1 (49% farinha), F2 (47% farinha), F3 (43% farinha), F4 (40% farinha) e F5 (37% farinha).

Em estudos anteriores (Raymundo et al., 2005) observou-se um comportamento de certa forma semelhante quando se adicionou *Chlorella* a emulsões alimentares. Nesse caso, com a adição de 2% de *Chlorella* foi possível reduzir o teor de óleo das emulsões de 65% até 55%, sem causar alteração das propriedades viscoelásticas, tendo esta microalga um efeito “*fat-mimetic*”.

Na Figura 34 encontram-se as curvas de escoamento realizadas para as massas com formulações F1 (controle), F2 (2% de microalga) e F3 (6% de microalga) utilizando *Spirulina*. Na Figura 35 estão representadas as curvas de escoamento das massas com diferentes percentagens de farinha: F1 (49% farinha - controle), F3 (43% farinha), F4 (40% farinha) e F5 (37% farinha).

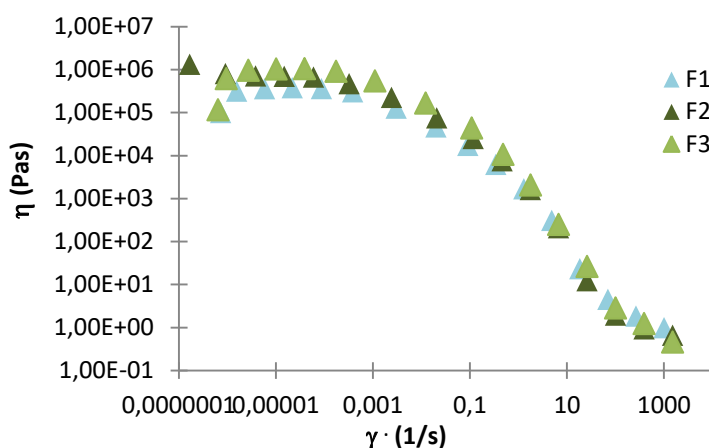


Figura 34 - Curvas de escoamento para as massas com formulação F1 (controle), F2 (2% alga) e F3 (6% alga) utilizando *Spirulina*.

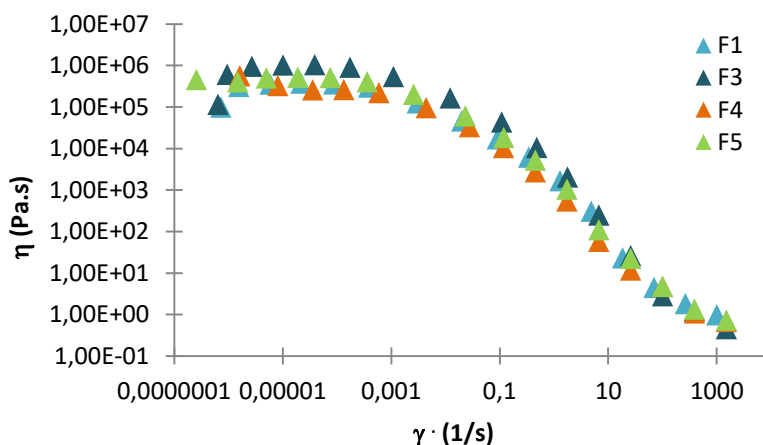


Figura 35 - Curvas de escoamento para as massas com 6% de *Spirulina* e diferentes concentrações de farinha: F1 (49% farinha), F3 (43% farinha), F4 (40% farinha) e F5 (37% farinha).

Analisando as curvas de escoamento apresentadas nas figuras anteriores (Figuras 34 e 35) verifica-se que, para todas as formulações, a viscosidade diminui com o aumento da velocidade de deformação (as ligações entre as moléculas vão-se quebrando e estas passam a ter um comportamento mais individualizado), indicando que as massas apresentam um comportamento reofluidificante. As curvas de escoamento apresentam perfis muito semelhantes para as diferentes formulações, verificando-se um aumento na viscosidade aparente com o aumento da concentração de *Spirulina* (Figura 34).

Tal como esperado, também se verifica uma diminuição na viscosidade aparente das massas com a redução do teor de farinha (Figura 35), embora para a formulação com 37% farinha + 6% *Spirulina* os valores de viscosidade sejam muito semelhantes aos da massa controlo (49% farinha, 0% *Spirulina*). Verifica-se que a formulação com 43% farinha + 6% *Spirulina* (F3) é a que apresenta valores de viscosidade mais elevado para velocidades de deformação baixas.

Todos estes resultados de curvas de escoamento são concordantes com os espetros mecânicos apresentados acima (Figuras 30 e 31), evidenciando um claro efeito estruturante com a adição de *Spirulina*. Estes resultados são promissores na medida em que sugerem a possibilidade de reduzir o teor de farinha de trigo nas formulações de bolachas. Por outro lado abre caminho para a futura utilização de farinhas mais “fracas”, como é o caso das farinhas sem glúten (e.g. arroz) no desenvolvimento de produtos para celíacos.

4.2.5 Avaliação da atividade da água

A atividade da água (a_w) das bolachas controlo e com incorporação de 2% e 6% de microalga foi medida de acordo com o indicado no capítulo 3.1.6. As Figuras 36 e 37 apresentam a variação da atividade da água das bolachas acima descritas na semana 0 e na semana 8.

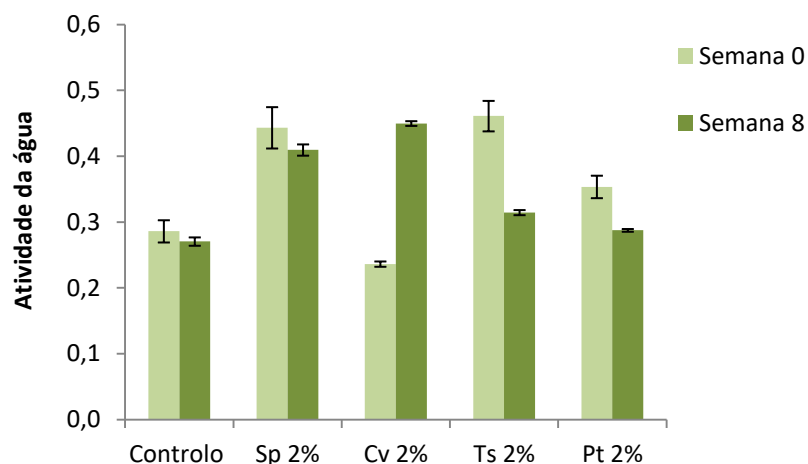


Figura 36 - Variação da atividade da água das bolachas controlo e com incorporação de 2% de microalga (Sp - *Spirulina*; Cv - *Chlorella*; Ts - *Tetraselmis*; Pt - *Phaeodactylum*) na semana 0 e na semana 8.

Através da análise da Figura 36 é possível verificar que na semana 0 não existem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o a_w da bolacha controlo e da bolacha com 2% de *Chlorella* (0,24-0,29). As restantes apresentaram valores significativamente ($p < 0,05$) mais altos, sendo os valores máximos obtidos para as bolachas com 2% *Spirulina* e 2% de *Tetraselmis* (0,44-0,46). A bolacha controlo não apresenta alterações significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo, o mesmo se verifica com a bolacha com 2% de *Spirulina*. O a_w da bolacha com 2% de *Chlorella* aumenta significativamente ($p < 0,05$) entre a semana 0 e a semana 8 e o das bolachas com 2% de *Tetraselmis* e *Phaeodactylum* diminui significativamente ($p < 0,05$) nesse intervalo de tempo. É de notar que os resultados referentes à semana 0 podem ter algum erro associado, uma vez que apresentam valores bastante mais elevados do que seria de esperar para uma bolacha.

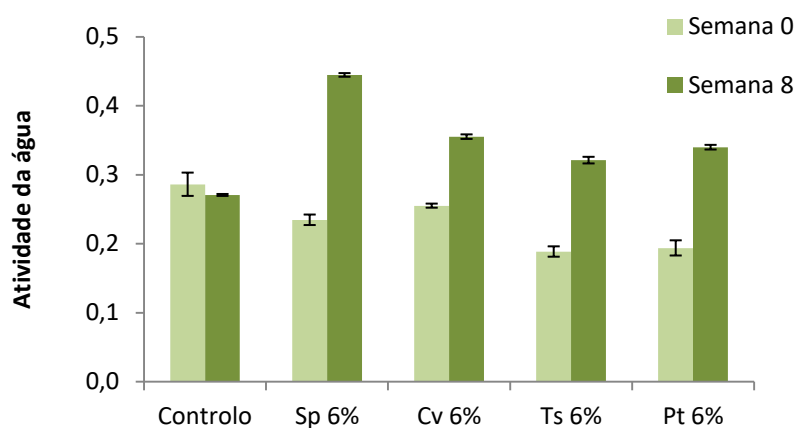


Figura 37 - Variação da atividade da água das bolachas controlo e com incorporação de 6% de microalga (Sp - *Spirulina*; Cv - *Chlorella*; Ts - *Tetraselmis*; Pt - *Phaeodactylum*) na semana 0 e na semana 8.

Relativamente às bolachas com 6% de microalga, através da análise da Figura 37 verifica-se que na semana 0, as bolachas com *Tetraselmis* e com *Phaeodactylum* não apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$) de a_w entre si, bem como as bolachas com *Spirulina* e *Chlorella*. Todas as bolachas apresentam valores de a_w significativamente ($p < 0,05$) mais baixos (0,19-0,26) em relação à bolacha controlo (0,29). Após 8 semanas de armazenamento verifica-se um aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade da água nas bolachas com incorporação de 6% de microalga, independentemente da microalga utilizada, enquanto a bolacha controlo se mantém estável. Estes resultados sugerem que, para uma incorporação relativamente elevada de biomassa de microalgas (6%), verifica-se uma diminuição imediata (semana 0, 1º dia) da água livre, o que está de acordo com os elevados valores de absorção de água das microalgas (Figura 19). No entanto, parece que a água absorvida não ficará fortemente ligada às macromoléculas, ocorrendo uma libertação (e consequente aumento do a_w) ao longo do tempo.

Verifica-se ainda que todas as formulações (controlo, com 2% e 6% de microalga) apresentam valores de a_w inferiores a 0,5, o que significa que apresentam uma baixa percentagem de água livre para o desenvolvimento microbiano e consequentemente uma elevada estabilidade ao longo do tempo. Contudo para valores baixos de a_w ocorrem várias reações degradativas tais como a oxidação lipídica (Labuza, 1980), reação a ter em consideração tendo em conta que as bolachas têm 20% de gordura na sua composição. Estas reações provocam perda do sabor original e formação de cheiro a ranço que comprometem a qualidade sensorial das bolachas. Uma forma de prevenir estas reações é a utilização de embalagens barreira ao oxigénio e à luz.

Tendo em conta os resultados de textura (Figura 29 e 30), não parece que as variações observadas no a_w tenham um impacto apreciável na textura das bolachas.

4.2.6 Avaliação das características químicas

A composição química das bolachas controlo e com incorporação de 2% e 6% de microalga foi determinada de acordo com os métodos descritos no capítulo 3.2.7. Os resultados obtidos, em percentagem, encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Composição química das bolachas controle e com incorporação de 2% e 6% de microalga (Sp - *Spirulina*; Cv - *Chlorella*; Ts - *Tetraselmis*; Pt - *Phaeodactylum*)*.

	Proteína (%)	Gordura total (%)	Humidade (%)	Cinza (%)	Hidratos de carbono (%) **	Energia (kcal/g)
Controle	4,9 ± 0,5 ^a	16,1 ± 0,1 ^a	3,8 ± 0,2 ^{ab}	2,7 ± 0,2 ^a	72,6	454
Sp 2%	6,1 ± 0,2 ^{abc}	16,1 ± 0,5 ^a	3,8 ± 0,1 ^{ab}	2,6 ± 0,4 ^a	71,4	455
Sp 6%	7,8 ± 0,3 ^{de}	16,1 ± 0,1 ^a	5,0 ± 0,2 ^d	2,3 ± 0,04 ^a	68,7	451
Cv 2%	5,9 ± 0,5 ^{abc}	16,3 ± 0,2 ^a	3,2 ± 0,1 ^a	2,3 ± 0,04 ^a	72,4	460
Cv 6%	8,0 ± 0,6 ^e	16,9 ± 0,4 ^a	4,8 ± 0,3 ^{cd}	2,6 ± 0,01 ^a	67,7	455
Ts 2%	5,2 ± 0,1 ^a	16,1 ± 0,1 ^a	3,4 ± 0,2 ^{ab}	2,4 ± 0,2 ^a	73,0	457
Ts 6%	6,9 ± 0,4 ^{cd}	16,3 ± 0,4 ^a	3,3 ± 0,1 ^a	3,2 ± 0,03 ^a	70,4	456
Pt 2%	5,1 ± 0,2 ^{ab}	16,1 ± 0,1 ^a	3,9 ± 0,03 ^{ab}	2,3 ± 0,2 ^a	72,6	456
Pt 6%	6,6 ± 0,4 ^{bc}	16,2 ± 0,1 ^a	4,3 ± 0,2 ^{bc}	3,0 ± 0,04 ^a	70,0	452

* Letras diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas (p<0.05).

** A composição em hidratos de carbono foi calculada por diferença sendo os valores obtidos sobrestimados, incluindo o valor das fibras e dos hidratos de carbono.

Comparando a composição da bolacha controle com a composição referenciada para a bolacha de manteiga na tabela de composição dos alimentos do Instituto Ricardo Jorge (2006) é possível verificar que em termos proteicos não se verificam diferenças significativas uma vez que o referenciado é 6,2 g e o valor obtido foi de 5,4, relativamente à gordura, obteve-se um valor mais baixo (16,1 g) do que o referenciado (21,3 g), em termos de humidade também não se verificaram diferenças, uma vez que o valor obtido foi de 3,8 g e o referenciado é de 3,4 g. O valor dos hidratos de carbono é sobrestimado (inclui fibras), obtendo-se um valor de 72,6 g sendo o referenciado de 65,2 g.

Os valores de proteína obtidos variam entre 5,1 - 6,1% para as bolachas com 2% de microalga e entre 6,6 - 8,0% para as bolachas com 6%. Verifica-se um aumento significativo (p<0,05) do teor proteico em todas as bolachas quando se aumenta a concentração de microalga, sendo as bolachas com *Spirulina* e com *Chlorella* que se destacam, como seria de esperar devido à sua composição química (Tabela 2).

Relativamente ao teor de gordura total, os valores variam entre 16,0 - 16,9% para as bolachas com incorporação de 2% e 6% de microalga, não se verificando diferenças significativas (p<0,05) quando se incorpora maior quantidade de microalga nem quando se altera a microalga.

Os valores de humidade variam entre 3,2 - 3,9% para as bolachas com 2% de microalga e entre 3,3 - 5,0% para as bolachas com 6% de microalga. De um modo

geral, verifica-se uma maior humidade nas bolachas com 6% de microalga, principalmente na *Chlorella* e na *Spirulina*.

Em relação às cinzas totais, os valores variam entre 2,3 - 3,0% para as bolachas com incorporação de 2% e 6% de microalga, isto é, não se verificaram diferenças significativas ($p>0,05$) no teor de cinza quando se aumenta a concentração de microalga. As bolachas com incorporação de 6% de *Tetraselmis* e *Phaeodactylum* são as que apresentam um teor de cinza mais elevado, resultado previsto tendo em conta a composição química das microalgas (Tabela 2).

Através do Reg (UE) Nº1169/2011 foi possível fazer uma estimativa do valor de energia metabolizável das bolachas, obtendo-se um valor de cerca de 455 kcal/g, não havendo diferenças assinaláveis com a incorporação de microalgas nem aumentando a concentração das mesmas.

4.2.7 Avaliação do teor de ficocianina e aloficocianina na massa e nas bolachas com *Spirulina*

Sendo as bolachas de *Spirulina*, as que apresentaram resultados mais interessantes em termos de textura, bem como de análise sensorial (ver secção 4.2.6), avaliou-se o teor de ficocianina e aloficocianina, pigmentos azuis característicos desta microalga com propriedades bioativas (Fernández-Rojas et al., 2014).

Os valores de ficocianina e aloficocianina presentes na massa e nas bolachas com *Spirulina* foram determinados de acordo com o método descrito no capítulo 3.2.7.5 e encontram-se nas Figura 38 (a) e (b) respetivamente.

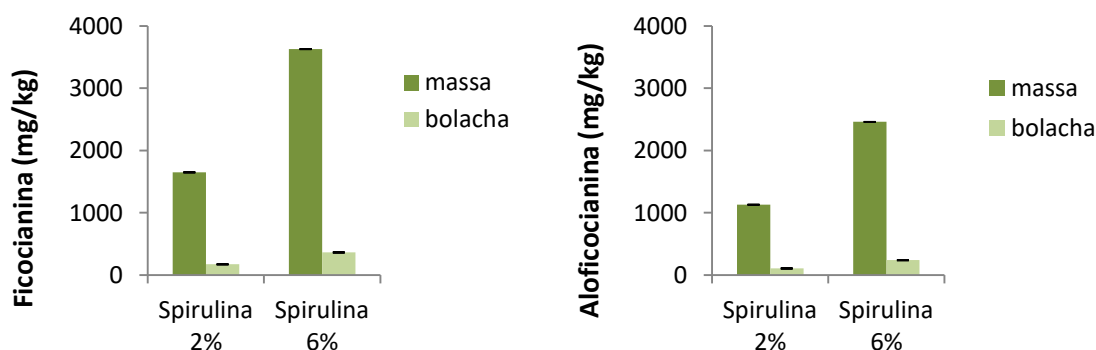


Figura 38 - Quantidade de Ficocianina (a) e Aloficocianina (b) presente na massa e na bolacha com 2% e 6% de *Spirulina*.

Através da análise da Figura 38 anteriormente verifica-se que, para ambos os pigmentos, independentemente da matriz (massa ou bolacha), quando se aumenta a concentração de 2% para 6% há um aumento significativo ($p < 0,05$) de ficocianina e aloficocianina. No entanto, verifica-se uma perda de 90% de ambos os pigmentos quando a massa é submetida a cozedura, verificando-se que estes pigmentos são sensíveis ao tratamento térmico aplicado (Martelli et al., 2014). O fato da *Spirulina* não possuir parede celular rígida também confere menor proteção a estes pigmentos. Contudo as bolachas apresentam valores de ficocianina de 172 mg/kg e 363 mg/kg para as bolachas com 2% e 6% de *Spirulina*, respetivamente.

Comparando com estudos anteriores, em géis alimentares (sobremesas) com 0,75% de *Spirulina* (Batista, 2012) verificaram-se perdas de cerca de 95-98% com valores finais de apenas 10-40 mg/kg. Considerando que o tratamento térmico dos géis se realizou entre os 75°C e os 90°C durante 5 min., enquanto nas bolachas se aplicaram 120°C durante 40 min. parece evidente que a matriz alimentar das bolachas é mais eficiente na preservação destes pigmentos.

Também se analisou a quantidade destes pigmentos na microalga obtendo-se um valor de 8% de ficocianina e 5% de aloficocianina.

4.2.8 Análise sensorial das bolachas

A prova de análise sensorial foi realizada de acordo com o descrito no capítulo 3.2.8, para as bolachas com *Chlorella* e *Spirulina*, pois as estirpes de *Tetraselmis* e *Phaeodactylum* utilizadas não estão ainda aprovadas como novos alimentos na União Europeia (Reg. 258/97). Para além disso, em provas restritas pela equipa de investigação, verificou-se que estas microalgas marinhas conferem um *flavour* muito intenso sendo menos apreciadas.

As bolachas foram avaliadas quanto à cor, ao cheiro, ao sabor, à textura, à apreciação global e à intenção de compra, através da utilização de uma escala hedónica que variava entre o "muito agradável" e "muito desagradável", de modo a obter um valor representativo de um dado atributo.

Na Figura 39 encontram-se as respostas dadas pelos provadores quando submetidos à prova das bolachas com 2% e 6% de *Chlorella* e com 2 e 6% de *Spirulina*. Estão representados em termos de número efetivo de provadores que escolheram a designação "muito agradável", "agradável", "ligeiramente agradável", "ligeiramente desagradável", "desagradável" e "muito desagradável" para os vários parâmetros avaliados.

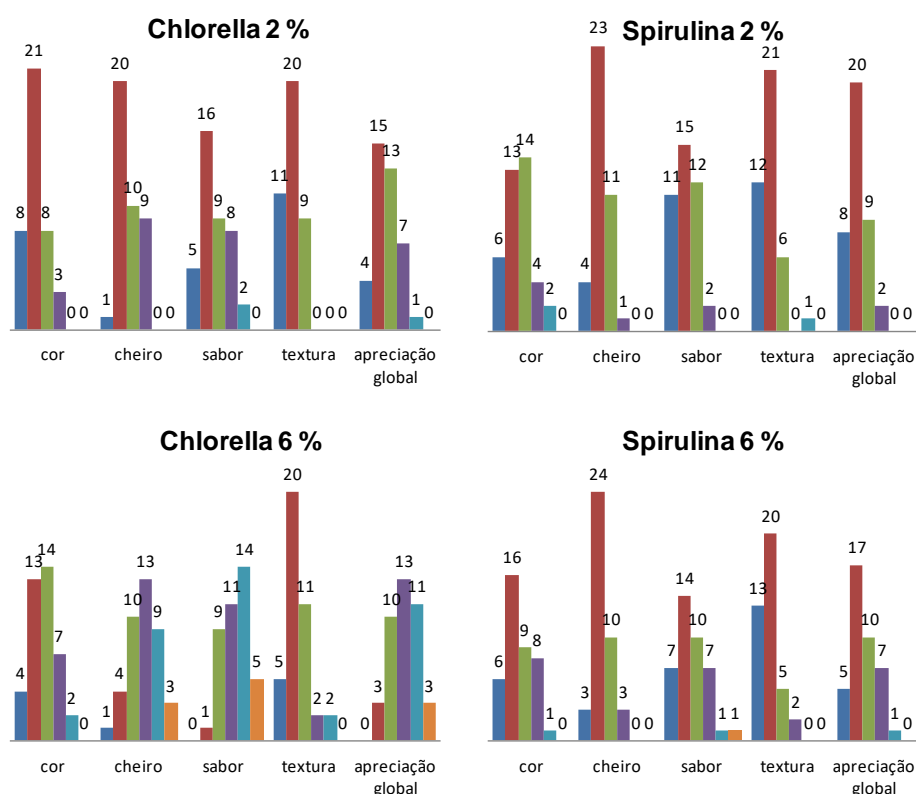


Figura 39 - Resposta dos provadores (n=40) quanto às bolachas com 2% e 6% de *Chlorella* e de *Spirulina* (azul escuro - muito agradável ; vermelho - agradável; verde - ligeiramente agradável; roxo - ligeiramente desagradável; azul claro - desagradável; laranja - muito desagradável).

Através da análise da Figura 39 é possível verificar que, relativamente à bolacha com 2% de *Chlorella*, 70% e 75% dos provadores consideraram a cor e a textura, respetivamente, muito agradável e agradável, 73% e 61% dos provadores consideraram o cheiro e o sabor, respetivamente, agradável e ligeiramente agradável. Na apreciação global, 62% dos provadores considerou esta bolacha agradável e ligeiramente agradável. Em relação à bolacha com 6% de *Chlorella*, 66% e 75% dos provadores consideraram a cor e a textura, respetivamente, agradável e ligeiramente agradável, 56% dos provadores considerou o cheiro ligeiramente agradável e ligeiramente desagradável, 61% dos provadores considerou o sabor ligeiramente

desagradável e desagradável. Na apreciação global, 58% dos provadores considerou esta bolacha ligeiramente desagradável e desagradável.

Na Figura 40 encontra-se representada, de forma resumida, a avaliação média para cada parâmetro das várias bolachas analisadas. Para "muito desagradável" atribuiu-se a pontuação 0, para "desagradável" a pontuação 1, para "ligeiramente desagradável" a pontuação 2, para "ligeiramente agradável" a pontuação 3, para "agradável" a pontuação 4 e para "muito agradável" a pontuação 5.

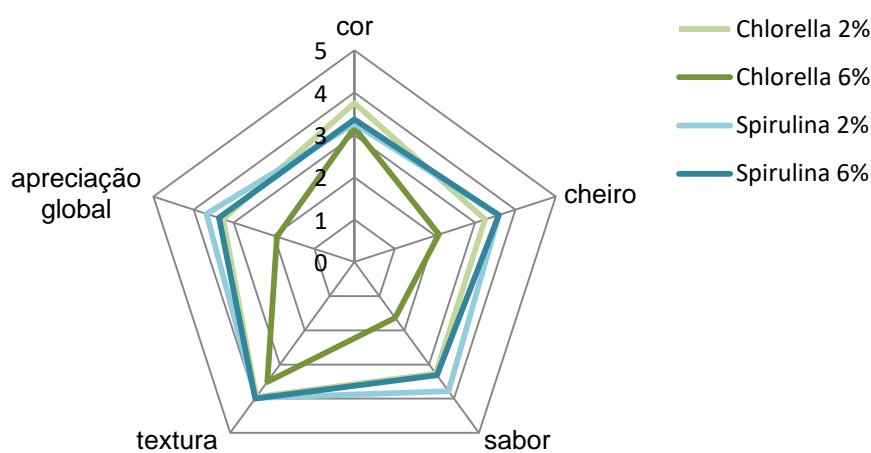


Figura 40 - Resposta dos provadores (n=40) quanto às bolacha com 2% e 6% de *Chlorella* e de *Spirulina* (0 - muito desagradável; 1 - desagradável; 2 - ligeiramente desagradável; 3 - ligeiramente agradável; 4 - agradável e 5 - muito agradável) (resumo).

Verifica-se que a bolacha claramente preterida dos provadores foi a bolacha com 6% de *Chlorella*. Em relação à cor, a bolacha preferida foi a bolacha com 2% de *Chlorella*. Em termos de cheiro, os provadores preferiram as bolachas com incorporação de *Spirulina*. Em termos de textura, não se verificaram diferenças entre as bolachas com *Spirulina* e a bolacha com 2% de *Chlorella*. Relativamente ao sabor e à apreciação global, a bolacha preferida foi de *Spirulina* 2%, tendo as bolachas com 6% de *Spirulina* e 2% de *Chlorella* scores semelhantes. Através da análise da Figura 40 é possível também verificar que a média dos atributos analisados não ultrapassou a escala 4, correspondente a "agradável".

Na Figura 41 encontram-se as respostas dadas pelos provadores em relação à intenção de compra, quando submetidos à prova das bolachas com 2% e 6% de *Chlorella* e com 2 e 6% de *Spirulina*.

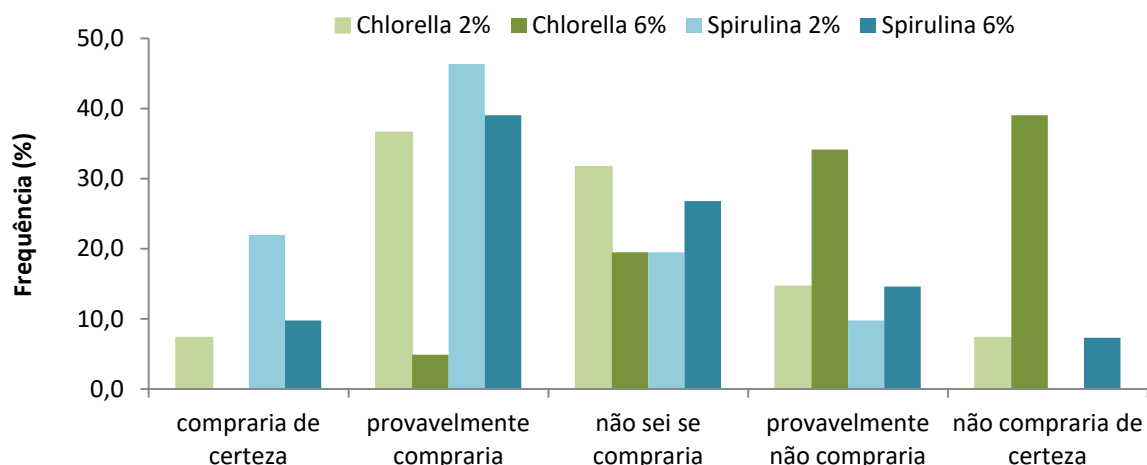


Figura 41 - Respostas dos provadores (n=40) relativamente à intenção de compra das bolachas.

Relativamente à intenção de compra, 44% dos provadores compraria de certeza e provavelmente compraria a bolacha com 2% de *Chlorella*, 73% dos provadores provavelmente não compraria e não compraria de certeza a bolacha com 6% de *Chlorella*, 68% dos provadores compraria de certeza e provavelmente compraria a bolacha com 2% de *Spirulina* e 66% dos provadores provavelmente compraria e não sabem se comprariam a bolacha com 6% de *Spirulina*.

No campo dos comentários, a bolacha com 2% de *Spirulina* foi considerada a mais crocante, saborosa e equilibrada em termos de sabor. Em relação à bolacha com 6% de *Spirulina* os provadores referiram que tinha uma cor demasiado escura, mas em termos de sabor era bastante agradável. Em relação à bolacha com 2% de *Chlorella* os provadores referiram que esta era a bolacha com a cor mais apelativa, embora apresentasse um sabor residual estranho. Por fim, em relação à bolacha com 6% de *Chlorella* os provadores referiram que esta tinha um sabor demasiado intenso a peixe que perdurava na boca (sensação *after-taste*).

Capítulo 5 - Conclusões e Proposta de trabalho futuro

A combinação do elevado valor nutritivo das microalgas com as suas propriedades corantes, associada a um aumento da procura de produtos funcionais, torna-as um ingrediente cada vez mais explorado pelas indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética.

A elaboração da presente tese teve como objetivo o desenvolvimento de bolachas doces, similares às tradicionais bolachas de manteiga, com incorporação de quatro microalgas diferentes em duas concentrações diferentes (2% e 6% m/m). De modo a avaliar a estabilidade das bolachas ao longo do tempo, a sua estrutura e a sua composição química, procedeu-se à realização de diversos testes/análises.

A adição de microalgas como ingrediente natural resulta na obtenção de bolachas mais saudáveis, e com uma aparência atrativa e inovadora.

As bolachas apresentaram uma tonalidade verde que se torna significativamente mais escura (diminuição de L^*), menos verde (aumento de a^*) e menos amarela (diminuição de b^*) com o aumento da concentração de biomassa microalgal, independentemente da microalga utilizada, mantendo no entanto a tonalidade constante (*hue angle* h°). Relativamente à textura, as bolachas com incorporação de *Spirulina* demonstraram maior firmeza que as restantes microalgas em análise. De um modo geral, os parâmetros colorimétricos e a textura apresentaram grande estabilidade ao longo do tempo, isto é, não apresentaram variação significativa ao longo do tempo.

Em todas as bolachas o valor de atividade da água foi inferior a 0,5, o que mais uma vez comprova a grande estabilidade deste produto.

Em termos de caracterização química das bolachas, de todos os parâmetros analisados verificaram-se maiores variações no teor proteico. De entre as amostras estudadas, as bolachas com 6% de *Spirulina* e de *Chlorella* apresentaram um teor proteico mais elevado (cerca de 8%, em comparação a 5% nas bolachas controlo).

A quantificação da ficocianina na massa crua e nas bolachas com *Spirulina* mostrou que há um aumento da quantidade deste pigmento com o aumento da concentração de microalga, embora se verifique um decréscimo de 90% deste pigmento quando a massa é submetida a cozedura.

Em relação às propriedades reológicas das massas, verificou-se que para todas as formulações estudadas o módulo G' apresentou sempre valores superiores ao G'' e ambos os módulos aumentam com o aumento da frequência. A formulação F3, contendo 43% de farinha de trigo e 6% de *Spirulina*, mostrou-se a mais estruturada. Verificou-se ainda que todas formulações analisadas apresentavam um comportamento reofluidificante pois a viscosidade diminui com a velocidade de deformação.

A análise sensorial revelou a preferência dos provadores pelas bolachas com incorporação de *Spirulina*, principalmente pela que continha menos concentração de microalga (2% m/m). A bolacha preterida foi a que continha 6% de *Chlorella*, uma vez que esta apresentava um sabor bastante intenso a peixe, natural da microalga.

De acordo com os resultados obtidos na presente tese, propõem-se como trabalhos futuros:

- Desenvolvimento de uma formulação, utilizando farinha de arroz em detrimento da farinha de trigo como uma opção para doentes celíacos ou com algum tipo de intolerância/alergia ao trigo;
- Desenvolvimento de uma formulação utilizando um adoçante natural;
- Desenvolvimento de bolachas salgadas tipo "*crackers*" utilizando as mesmas microalgas, e tentando incorporar 8% (m/m) de biomassa nessa matriz.

Referências bibliográficas

- Abu-Ghosh, S., Fixler, D., Dubinsky, Z. & Illuz, D. (2016). Flashing light in microalgae biotechnology. *Bioresource Technology* , 203, 357-363.
- AOAC method 950.36 (1950). Official methods of analysis - Protein in bread (16th ed.), 4th Revision. Gaithersburg, USA.
- Barrera, G.N., Bustos, M.C., Iturriaga, L., Flores, S.K., León, A.E. & Ribotta, P.D. (2013). Effect of damaged starch on the rheological properties of wheat starch suspensions. *Journal of Food Engineering* , 116, 233-239.
- Batista, A.P. (2012). *Incorporación de pigmentos naturales y microalgas en sistemas coloidales alimentarios: caracterización del comportamiento reológico*. Tesis Doctoral, Universidade de Huelva, Departamento de Ingeniería Química, Química Física y Química Orgánica, Huelva.
- Batista, A.P., Gouveia, L., Bandarra, N.M., Franco, J.M. & Raymundo, A. (2013). Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research* , 2, 164-173.
- Becker, E.W. (2004). Microalgae in human and animal nutrition. In A. Richmond (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (pp. 312-351). Blackwell Publishing Ltd.
- Begum, H., Yusoff, F., Banerjee, S., Khatoon, H. & Shariff, M. (2016). Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* , 56, 2209-2222.
- Bishop, W. & Zubeck, H. (2012). Evaluation of Microalgae for use as Nutraceuticals and Nutricional Supplements. *Nutricion & Food Sciences* , 2, 147.
- Blaszczyk, W., Fornal, J. & Ramy, A. (2004). Effect of emulsifiers addition on dough properties, baking quality and microstructure of biscuits. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* , 13, 343-348.
- Borowitzka, M. (1995). Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active. *Journal of Applied Phycology* , 7, 3-15.
- Borowitzka, M.A. (1992). Algal biotechnology products and processes - matching science and economics. *Journal of Applied Phycology* , 4, 267-279.

Bourne, M.C. (2002). *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement*. Academic Press, 2nd Ed, London, U.K.

Boussiba, S. & Richmond, A.E. (1979). Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*, 120, 155-159.

Cardoso, A.S., Vieira, G.E. & Marques, A.K. (2011). O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. *Revista Brasileira de Biociências*, 9, 542-549.

Carrilho, L.S. (2014) *Bolachas sem glúten a partir de subprodutos da indústria*. Tese de mestrado em Engenharia Alimentar, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.

Castellar, M.R., Obón, J.M & Fernández-López, J.A. (2006). The isolation and properties of a concentrated red-purple betacyanin food colourant from *Opuntia stricta* fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 122-128.

Chu, W. (2012). Biotechnological applications of microalgae. *International e-Journal of Science, Medicine and Education*, 6, 24-37.

CIE (1978). *Recommendations on uniform color spaces, color difference equations, psychometric colour terms*. Commission Internationale de l'Eclairage (CIE), Publication No. 15 (E-1.3.1) 1971, Supplement 2. Viena: Bureau Central de la CIE.

Costa, J. & Morais, M. (2011). The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresource Technology*, 102, 2-9.

De Marco, E.R., Steffolani, M.E., Martínez, C.S. & León, A.E. (2014). Effects of *Spirulina* biomass on the technological and nutritional quality of bread wheat pasta. *LWT - Food Science and Technology*, 58, 102-108.

Dewapriya, P. & Kim, S. (2014). Marine microorganisms: An emerging avenue in modern nutraceuticals and functional foods. *Food Research Internacional*, 56, 115-125.

Draaisma, R.D., Wijffels, R.H., Slegers, P.M., Brentner, L.B., Roy, A. & Barbosa, M.J. (2013). Food commodities from microalgae. *Biotechnology*, 24, 169-177.

Fajardo, A.R., Cerdán, L.E., Medina, A.R., Acien Fernández, F.G., Moreno, P.A.G & Molina Grima, E. (2007). Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 120-126.

- Fernández-Rojas, B., Hernández-Juárez, J. & Pedraza-Chaverri, J. (2014). Nutraceutical properties of phycocyanin. *Journal of Functional Foods* , 11, 375-392.
- Fradique, M., Batista, A.P., Nunes, C.M., Gouveia, L., Bandarra, N.M. & Raymundo, A. (2010). Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: Preparation and evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* , 90, 1656–1664.
- Fradique, M., Batista, A.P., Nunes, C.M., Gouveia, L., Bandarra, N.M. & Raymundo, A. (2013). *Isochrysis galbana* and *Diacronema vlkianum* biomass incorporation in pasta products as PUFA's source. *LWT - Food Science and Technology* , 50, 312-319.
- Germano, J.P. (2014). *Desenvolvimento de rebuçados com incorporação de microalgas*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Alimentar, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Gershwin, M.E. & Belay, A. (2008). *Spirulina in human nutrition and health*. New York: CRC Press .
- Gouveia, L., Batista, A.P., Miranda, A., Empis, J. & Raymundo, A. (2007). *Chlorella vulgaris* biomass used as colouring source in tradicional butter cookies. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* , 8, 433-336.
- Gouveia, L., Batista, A.P., Sousa, I., Raymundo A. & Bandarra, N.M. (2008 a). Microalgae in Novel Food Products. Nova Science Publishers.
- Gouveia, L., Coutinho, C., Mendonça, E., Batista, A.P., Sousa, I., Bandarra, N.M. & Raymundo, A. (2008 b). Functional biscuits with PUFA- ω 3 from *Isochrysis galbana*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* , 88, 891–896.
- Gouveia, L., Veloso, V., Reis, A., Fernandes, H., Novais, J. & Empis J. (1996). Evolution of pigment composition in *Chlorella*. *Bioresource Technology* , 57, 157-163.
- Gouveia, L., Batista, A.P., Raymundo, A. & Bandarra, N. (2008). *Spirulina maxima* and *Diacronema vlkianum* microalgae in vegetable gelled desserts. *Nutrition & Food Science* , 38, 492 - 501.
- Guedes, A.C., Amaro, H.A., & Malcata, F.X. (2011). Microalgae as Sources of Carotenoids. *Marine Drugs* , 9, 625-644.

- Hamilton, M. H. (2014). Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricornutum* for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Metabolic Engineering* , 22, 3-9.
- Leach, H. W., McCowen, I. D., & Schoch, T. J. (1959). Structure of the starch granule. I. Swelling and solubility patterns of various starches. *Cereal Chemistry*, 36, 534–544.
- Kim, S.M., Jung, Y., Kwon, O., Cha, K.H., Um, B., Chung, D & Pan, C. (2012). A Potential Commercial Source of Fucoxanthin Extracted from the Microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* , 166, 1843-1855.
- Lordan, S., Ross, R.P. & Stanton, C. (2011). Marine Bioactives as Functional Food Ingredients: Potential to Reduce the Incidence of Chronic Diseases. *Marine Drugs* , 9, 1056-1100.
- Maache-Rezzoug, Z., Bouvier, J., Alla, K. & Patras, C. (1998). Effect of Principal Ingredients on Rheological Behaviour of Biscuit Dough and on Quality of Biscuits. *Journal of Food Engineering* , 35, 23-42.
- Manley, D. (1998). *Biscuit, cookie and cracker manufacturing manuals - Ingredients* (Vol. 1). Cambridge, England: Woodhead Publishing.
- Martelli, G., Folli, C., Visai, L., Dagliae, M. & Ferrari, D. (2014). Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. *Process Biochemistry*, 49, 154–159.
- Martins, I. (2006) Tabela da Composição de Alimentos. 1ª Edição Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. 255p.
- Mercado, R.G. (2011). *Inducción de productos bioactivos en la microalga marina Tetraselmis suecica*. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, Departamento de Ingeniería Química, Santiago de Compostela .
- Mezger, T.G. (2002). *The Rheology Handbook*. Vincentz.
- Mikami, K. & Hosokawa, M. (2013). Biosynthetic Pathway and Health Benefits of Fucoxanthin, an Algae-Specific Xanthophyll in Brown Seaweeds. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 13763–13781.
- Mieszkowska, A. & Marzec, A. (2015). Structure analysis of short-dough biscuits and its correlation with sensory discriminants. *Journal of Texture Studies* , 46, 313–320.

- Milledge, J.J. (2010). Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review . *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* , 10, 31-41.
- Moraes, K., Zavareze, E., Miranda, M. & Salas-Mellado, M. (2010). Avaliação tecnológica de biscoitos tipo cookie com variações nos teores de lipídio e de açúcar. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos* , 30, 233-242.
- Mostafa, S.S. (2012). Microalgal Biotechnology: Prospects and Applications. *Plant Science* , 276-312.
- Navacchi, M.F., Carvalho, J.C., Takeuchi, K.P. & Danesi, E.D. (2012). Development of cassava cake enriched with its own bran and *Spirulina platensis*. *Acta Scientiarum* , 34, 465-472.
- Niccolai, A., Bigagli, E., Biondi, N., Rodolfi, L., Cinci, L., Luceri, C. & Tredici, M.R. (2016). *In vitro* toxicity of microalgal and cyanobacterial strains of interest as food source. *Journal of Applied Phycology* , 11.
- Norma Portuguesa NP4168. (1991). Cereais e Derivados - Determinação do teor de matéria gorda total. Lisboa: Instituto Português da Qualidade.
- Norma Portuguesa NP 518. (1986). Cereais e Leguminosas - Determinação do teor de cinza. Processo por incineração a 550°C. Lisboa: Instituto Português da Qualidade.
- Pareyt, B. & Delcour, J.A. (2008). The Role of Wheat Flour Constituents, Sugar, and Fat in Low Moisture Cereal Based Products: A Review on Sugar-Snap Cookies. *Food Science and Nutrition* , 48, 824-839.
- Plaza, M., Herrero, M., Cifuentes, A. & Ibañez, E. (2009). Innovative Natural Functional Ingredients from Microalgae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 57, 7159-7170.
- Piteira, F.M., (2006) . *Optimization and study of enriched fiber cookies as a functional food*. Tese de Doutoramento em Agro-indústrias, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Raymundo, A. (2003). Emulsões Alimentares. Em *A Química e a Reologia no Processamento dos Alimentos*, Ed. A. Gomes de Castro. Instituto Piaget, Coleção Ciência e Técnica (nº25). PP. 91-117.

Raymundo, A., Gouveia, L., Batista, A.P., Empis, J. e Sousa, I. (2005). Fat mimetic capacity of *Chlorella vulgaris* biomass in oil-in-water food emulsions stabilized by pea protein. *Food Research International*, 38, 961-965.

Raymundo, A., Fradinho, P. & Nunes, M.C. (2014). Effect of Psyllium fibre content on the textural and rheological characteristics of biscuit and biscuit dough. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 3, 96-105.

Regulamento (UE) n.º 258/97 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 27 de Janeiro de 1997 relativo a novos alimentos e ingredientes alimentares.

Regulamento (UE) n.º 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de Dezembro de 2006 relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos.

Regulamento (UE) n.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de Outubro de 2011 relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios.

Reis, A.; Mendes, A.; Lobo-Fernandes, H.; Empis, J.A.; Maggiolly Novais, J. (1998). Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp. *Bioresource Technology*, 66, 181-187.

Richmond, A. (2004). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science Ltd.

Rocha, R.P. (2015). *Ácidos gordos Polinsaturados no controlo e prevenção de Doenças Cardiovasculares*. Dissertação de Licenciatura em Ciências da Nutrição, Universidade Fernando Pessoa, Porto.

Semião, F.J. (2013). *Produção de single cell oil para biodiesel a partir da microalga Chlorella protothecoides em cultivo autotrófico e heterotrófico em simultâneo com troca simbiótica de correntes gasosas em circuito fechado*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Biológica, Instituto Superior Tecnico , Lisboa .

Silva, B., Moreira, J., Morais, M. & Costa, J. (2016). Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. *Food Science* .

Singh, P., Singh, R., Jha, A., Rasane, P. & Gautam, A.K. (2013). Optimization of a process for high fibre and high protein biscuit. *Journal of Food Science and Technology* , 52, 1394–1403.

Spolaore, P., Joannis - Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A. (2006). Commercial Application of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* , 101, 87-96.

Tredici, M.R., Bassi, N., Prussi, M., Biondi, N., Rodolfi, L., Chini Zitelli, G. & Sampietro, G.(2015). Energy balance of algal biomass production in a 1-ha " Green Wall Panel" plant: How to produce algal biomass in a closed reactor achieving a high Net Energy Ratio. *Applied Energy*, 154, 1103-1111.

Tsai, H., Chuang, L. & Chen, C. (2016). Production of long chain omega-3 fatty acids and carotenoids in tropical areas by a new heat-tolerant microalgae *Tetraselmis* sp. DS3. *Food Chemistry* , 192, 682-690.

Vaz, B.S., Moreira, J.B., Morais, M.G. & Costa, J.A. (2016). Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements . *Current opinion in Food Science* , 7, 73-77.

Wade, P. (1988). *Biscuits, Cookies and Crackers - Principles of the craft* (Vol. 1). Essex, England: Elsevier Applied Science Publishers.

Webgrafia:

Lowara (2003). *BG Series- Self- priming centrifugal pumps*. Disponível em: <http://www.lowara.com>. Acesso em 20/12/2003.

Biodieselbr (2012). Os desafios do biodiesel de algas. Disponível em:<https://www.biodieselbr.com/noticias/colunistas/gazzoni/desafios-biodiesel-algas-060212.htm>. Acesso em 15/09/2016.

McCauley's (2014). *Chlorella Cultivation*. Disponível em: <http://blog.watershed.net/wp-content/uploads/2014/05/chlorella-pond2.jpg>. Acesso em 15/09/2016.

Acuicultura Marina (2015). *El cultivo de algas es sostenible, además contienen muchas proteínas y son ricas en Omega 3*. Disponível em: <https://acuiculturamarina.com/2015/02/11/piensos-animales-con-algas/>. Acesso em 15/09/2016.

ENVIS Centre on Environmental Biotechnology. *Mass Culture of Spirulina*.Disponível em: <http://deskuenvvis.nic.in/extension.asp>. Acesso em 15/09/2016.

Seahorse breeder. *Tetraselmis suecica live phytoplankton inoculant for culturing*. Disponível em: <http://seahorsebreeder.co.uk/store/live-phytoplankton-culturing/836-tetraselmis-suecica>. Acesso em 15/09/2016.

Wikipédia (2016). *Phaeodactylum tricornutum*. Disponível em:
https://en.wikipedia.org/wiki/Phaeodactylum_tricornutum. Acesso em 15/09/2016.

Anexos

Anexo 1 (a) - Conferência EUALGAE

Developing Microalgal Food Bioproducts – rheological approach for bakery products

Ana Paula Batista*, Patrícia Fradinho, Solange Fragoso, Carla Graça, Isabel Sousa, Anabela Raymundo

LEAF-Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa. Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal.

* Corresponding author: paulabatista@isa.ulisboa.pt

Microalgae contain several bioactive compounds that can provide nutrients, contribute to fulfilling the energy needs of the population, promote health and prevent chronic disease. However, the use of microalgae as a food source is still poorly developed due to technical difficulties related to their cultivation, strict European Legislation regarding Novel Foods and low demand in European countries compared to Asian Markets. To be competitive is essential to differentiate algae-food bioproducts through the use of European Premium Quality Biomass, to develop industrial and gastronomic applications with higher added value. But besides nutritional effects, the development of novel algal-foods can also involve severe structural effects, especially in complex food systems, that should be properly monitored namely through rheological techniques.

In this research, a case study for microalgae-based bakery goods (bread and cookies) was developed, with special focus on rheological characteristics. Relatively high algal concentrations were tested, up to 6% in bread and 8% in cookies, and the resulting sensorial, chemical, texture and colour properties analysed. The impact of algal addition on the technological aptitude of wheat flour was also assessed.

In the case of bread, the effect of algal addition on the rheological properties of wheat flour dough was assessed by farinograph and alveograph, showing an increase in the water absorption and extensibility of the dough. *In-situ* dough fermentation assays were also carried out in a controlled-stress rheometer, being observed for the algae samples an increase on the viscoelastic properties in relation to the control, contributing to the strengthening of the gluten network.

Regarding cookies, the effect of algal addition on water and oil absorption was also tested. The rheological and texture properties of dough and biscuits a structural reinforcement in relation to the control.

Overall, both bread and cookies samples enriched with algae showed good sensorial acceptance and positive rheological effects.

Anexo 1 (b) - Conferência ALGAEUROPE

Microalgae biscuits – sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and *in-vitro* digestibility

Ana Paula Batista¹, Alberto Niccolai², Patrícia Fradinho¹, Solange Fragoso¹, Isabel Sousa¹, Anabela Raymundo¹, Liliana Rodolfi^{2,3}, Natascia Biondi², Mario R. Tredici²

¹ LEAF – Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food. Instituto Superior de Agronomia. Universidade de Lisboa, Portugal; ² Department of Agrifood Production and Environmental Sciences (DISPAA), University of Florence, Italy; ³ Fotosintetica & Microbiologica S.r.l., Florence, Italy

Microalgae use as food is still poorly developed in Europe due to high cost, low demand and strict Novel Foods legislation. The aim of this work was to evaluate biscuits, a food product consumed on a daily basis, as microalgae vehicle. *Arthrospira platensis* F&M-C256, *Chlorella vulgaris* Allma, *Tetraselmis suecica* F&M-M33 and *Phaeodactylum tricornutum* F&M-M40 were studied. Two content levels were tested: 2%(w/w) typically used in algal-based products and a significantly higher content, 6%(w/w), to provide additional algal-bioactives. The biscuits sensory and physical properties were evaluated during 8 weeks and no significant differences were found ($p<0.05$) in terms of colour and texture stability. *A. platensis* biscuits presented the highest sensory scores. Besides, this alga also provided a significant ($p<0.05$) structuring effect, in terms of biscuits texture and dough viscosity.

All microalgae-based biscuits showed significantly higher total phenolic content (TPC) compared to the control. *P. tricornutum* biscuits exhibited the highest TPC (0.31 and 0.62 mgGAE/g for 2 and 6% biscuits). Microalgae biscuits presented significantly higher *in vitro* antioxidant capacity (AC) compared to the control (from +45% to +307%). 6% *T. suecica* biscuits presented the highest AC (25 mmolTEAC/kg). The microalgal biscuits *in vitro* digestibility (IVD) was also assessed. No significant difference in IVD between microalgae biscuits and the control (IVD 95%) was found, although, as expected, biscuits added with 6% Chlorophyceae biomass exhibited the lowest digestibility (87%).

In general, increasing microalgae content from 2% to 6% resulted in a significant increase in the biscuits TPC (on average +115%) and AC (on average +69%), while digestibility was slightly lower (-5.9% on average).

This work was supported by national funds from Fundação para a Ciência e a Tecnologia through the research unit UID/AGR/04129/2013 (LEAF).

Anexo 2 - Folha de prova

Idade:

Género: () Masculino () Feminino

Código da amostra:

Assinale com um X a classificação que acha mais adequada para cada atributo.

Cor

- ☐ Muito agradável
- ☐ Agradável
- ☐ Ligeiramente agradável
- ☐ Ligeiramente desagradável
- ☐ Desagradável
- ☐ Muito desagradável

Cheiro

- ☐ Muito agradável
- ☐ Agradável
- ☐ Ligeiramente agradável
- ☐ Ligeiramente desagradável
- ☐ Desagradável
- ☐ Muito desagradável

Sabor

- ☐ Muito agradável
- ☐ Agradável
- ☐ Ligeiramente agradável
- ☐ Ligeiramente desagradável
- ☐ Desagradável
- ☐ Muito desagradável

Textura

- ☐ Muito agradável
- ☐ Agradável
- ☐ Ligeiramente agradável
- ☐ Ligeiramente desagradável
- ☐ Desagradável
- ☐ Muito desagradável

Apreciação global

- ☐ Muito agradável
- ☐ Agradável
- ☐ Ligeiramente agradável
- ☐ Ligeiramente desagradável
- ☐ Desagradável
- ☐ Muito desagradável

Intenção de compra

- ☐ Compraria de certeza
- ☐ Provavelmente compraria
- ☐ Não sei se compraria
- ☐ Provavelmente não compraria
- ☐ Não compraria de certeza

Observações:

Anexo 3 - Testes de varrimento de tensão

